

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-179495

(43)公開日 平成7年(1995)7月18日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	府内整理番号	F I	技術表示箇所
C 07 K 14/435		8318-4H		
14/705				
C 12 N 1/21		8828-4B		
15/09	Z NA	9281-4B	C 12 N 15/00	Z NA A
			審査請求 有	発明の数 7 OL (全 60 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平6-185917
(62)分割の表示 特願昭60-505040の分割
(22)出願日 昭和60年(1985)10月28日

(31)優先権主張番号 666,080
(32)優先日 1984年10月29日
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 721,267
(32)優先日 1985年4月8日
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 788,370
(32)優先日 1985年10月22日
(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 594134095
マイクロジェニックス コーポレーション
MICROGENICS CORPORATION
アメリカ合衆国 カルフォルニア州
94520 コンコード スタンウェル ドラ
イブ 2341
(72)発明者 ヘンダーソン, ダニエル ロバート
アメリカ合衆国 カルフォルニア州
95410 ベニシア チャドウィック ウェ
イ 216
(74)代理人 弁理士 八田 幹雄

(54)【発明の名称】 酵素ドナーポリペプチドおよび酵素アクセプターポリペプチド

(57)【要約】

【目的】 高い(10^{-15} M)感受性において、高分子量および低分子量(分子量150 ~30,000ダルトン)の双方の検体の定量的分析のための酵素相補性検定に使用する酵素ドナーポリペプチドおよび酵素アクセプターポリペプチドを提供する。

【構成】 酵素ドナーがスルフヒドリル、アミノおよびカルボキシル基から成る群から選ばれた反応性基を有し、上記反応性基は活性酵素複合体を形成する酵素ドナー結合体と酵素アクセプターとの相互作用によるまたは酵素ドナー結合体の検体結合タンパク質および酵素アクセプターへの競合結合によるいずれかの妨害なしに検体または検体誘導体に共有結合できるものである、酵素アクセプターとの相互作用で β -ガラクトシダーゼの活性特性を有する活性酵素複合体を形成可能な酵素ドナーポリペプチドをコードするDNA配列を有する、酵素ドナーポリペプチド。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 酵素ドナーがスルフヒドリル、アミノおよびカルボキシル基から成る群から選ばれた反応性基を有し、上記反応性基は活性酵素複合体を形成する酵素ドナー結合体と酵素アクセプターとの相互作用によるまたは酵素ドナー結合体の検体結合タンパク質および酵素アクセプターへの競合結合によるいずれかの妨害なしに検体または検体誘導体に共有結合できるものである、酵素アクセプターとの相互作用で β -ガラクトシダーゼの活性

Asp Pro Ser Gly Asn Pro Tyr Gly Ile Asp Pro Thr Glu Ser Ser Pro
 Gly Asn Ile Asp Pro Arg Ala Ser Ser Asn Ser Leu Ala Val Val Leu Gln
 Arg Arg Asp Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Glu Leu Asn Arg Leu Ala Ala
 His Pro Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Glu Glu Ala Arg Thr Asp -X-
 Pro Ser Gln Gln Leu Arg Ser Leu Asn Gly Leu Glu Ser Arg Ser Ala Gly
 Met Pro Leu Glu

ただし、XはCysまたはLysである。

【請求項3】 酵素ドナーが図16のBamH I-Sal I フラグメントからなり、さらにスルフヒドリル、アミノおよびカルボキシル基から成る群から選ばれた反応性基を有し、上記反応性基は活性酵素複合体を形成する酵素ドナー結合体と酵素アクセプターとの相互作用によるまたは酵素ドナー結合体の検体結合タンパク質および酵素アクセプターへの競合結合によるいずれかの妨害なしに検体または検体誘導体に共有結合できるものである、酵素アクセプターとの相互作用で β -ガラクトシダーゼの活性特性を有する活性酵素複合体を形成可能な酵素ドナーポリペプチド。

【請求項4】 酵素ドナーがスルフヒドリル、アミノおよびカルボキシル基から成る群から選ばれた反応性基を有し、上記反応性基は活性酵素複合体を形成する酵素ドナー結合体と酵素アクセプターとの相互作用によるまたは酵素ドナー結合体の検体結合タンパク質および酵素アクセプターへの競合結合によるいずれかの妨害なしに検体または検体誘導体に共有結合できるものである、酵素ドナーとの相互作用で β -ガラクトシダーゼの活性特性を有する活性酵素複合体を形成可能な酵素アクセプターポリペプチドをコードするDNA配列を有する、酵素アクセプターポリペプチド。

【請求項5】 該酵素アクセプターがEA22である請求項4に記載の酵素アクセプターポリペプチド。

【請求項6】 DNA配列の複製および発現を指示できる発現制御配列と有効に結合した(in operative association with)請求項1、2または3に記載の酵素ドナーポリペプチドをコードするDNA配列を有する組換えベクター。

【請求項7】 該ベクターがp169、またはその突然変異体、組換え体若しくは遺伝子操作による誘導体である請求項6に記載の組換えベクター。

【請求項8】 請求項6または7に記載のベクターを含む細胞。

*性特性を有する活性酵素複合体を形成可能な酵素ドナーポリペプチドをコードするDNA配列を有する、酵素ドナーポリペプチド。

【請求項2】 酵素ドナーが下記のアミノ末端で始まるアミノ酸配列を有するものである、酵素アクセプターとの相互作用により β -ガラクトシダーゼの活性特性を有する活性酵素複合体を形成可能な酵素ドナーポリペプチド：

Asp Pro Ser Gly Asn Pro Tyr Gly Ile Asp Pro Thr Glu Ser Ser Pro
 Gly Asn Ile Asp Pro Arg Ala Ser Ser Asn Ser Leu Ala Val Val Leu Gln
 Arg Arg Asp Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Glu Leu Asn Arg Leu Ala Ala
 His Pro Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Glu Glu Ala Arg Thr Asp -X-
 Pro Ser Gln Gln Leu Arg Ser Leu Asn Gly Leu Glu Ser Arg Ser Ala Gly
 Met Pro Leu Glu

【請求項9】 IV Iに寄託し、受託番号IV I 10 0.5.2で指定されたエシエリキア・コリ バクテリア細胞、またはその突然変異体、組換え体若しくは遺伝子操作による誘導体。

20 【請求項10】 DNA配列の複製および発現を指示できる発現制御配列と有効に結合した(in operative association with)請求項4または5に記載の酵素アクセプターポリペプチドをコードするDNA配列を有する組換えベクター。

【請求項11】 該DNAベクターがpF29、またはその突然変異体、組換え体若しくは遺伝子操作による誘導体である請求項10に記載の組換えベクター。

30 【請求項12】 該DNAベクターがpMG22、またはその突然変異体、組換え体若しくは遺伝子操作による誘導体である請求項10に記載の組換えベクター。

【請求項13】 請求項10、11または12に記載のベクターを含む細胞。

【請求項14】 IV Iに寄託し、受託番号IV I 1 0051で指定されたエシエリキア・コリ バクテリア細胞、またはその突然変異体、組換え体若しくは誘導体。

【請求項15】 IV Iに寄託し、受託番号IV I 1 0038で指定されたエシエリキア・コリ バクテリア細胞、またはその突然変異体、組換え体若しくは誘導体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、酵素相補性検定による被検体の定性的および定量的分析に関する改良された方法に使用する酵素ドナーポリペプチドおよび酵素アクセプターポリペプチドに関するものである。より詳しくは、本発明は、組換えDNA技術および化学的ポリペプチド合成技術の双方により誘導された変形酵素、およびこのような酵素の均質系[homogeneous]および不均質系[heterogeneous]のエンザイムイムノアッセイ(酵素免

免疫検定法)に使用する酵素ドナーポリペプチドおよび酵素アクセプターポリペプチドに関するものである。また組換えDNA誘導された及び化学合成された酵素およびこのような酵素の均質系および不均質系の受容体-配位子(レセプター-リガンド)相補性検定に使用する酵素ドナーポリペプチドおよび酵素アクセプターポリペプチドをも含むものである。

【0002】

【従来の技術】

免疫検定系について

先行技術は、ヤーロウとベーソン [Yallow and Berson] (1960年, ジェイ. クリン. インベスト., 39: 1157 [J. Clin. Invest., 39: 1157])によるラジオイムノアッセイ (RIA) の開拓的発展に端を発する多くの免疫検定法(イムノアッセイ)を教示する。RIAは、所定量の特異的抗体に対して所定量の放射性標識された検体を未知量の標識されていない検体と競合させることによって特徴づけられる。抗体に結合したあるいは溶液中に遊離している放射性検体の量が適当なカウンターにおいて定量され、非放射性検体の濃度が決定される。この一般的な機構における改良は、(1) 放射性トレーサーの酵素あるいは蛍光トレーサーとの置換、(2) 多クローニン性(ポリクローナル)動物抗体の単クローニ性(モノクローナル)抗体との置換、(3) 分光光度計、蛍光測光計、蛍光偏光計および粒子数測定器を含む信号検知の改良された方法、ならびに(4) 結合したトレーサーの遊離トレーサーからの物理的分離を必要としない均質系の検定法の導入を含むものである。結合したトレーサーの遊離トレーサーからの分離は、プラスチック、紙、ガラスあるいはアクリルアミドなどのような固形支持体をしばしば必要とするものである。慣例上抗体は、固相に結合し、一方トレーサーと未知物は溶液中に遊離している。結合/遊離分離は、固相の1ないしそれ以上の洗浄によって達成される。残留する結合した活性が次に計測される。このような検定法は、総じて不均質系の免疫検定法として公知である。これに対して、均質系の検定法は、不正確でかつ時間浪費の分離段階の必要性を除去するものである。

【0003】免疫検定法の商業化によって、ラジオイムノアッセイから、酵素結合イムノソルベント検定法(ELISA)へ、均質系の検定法へ使用されるようになった。この変遷は、スピード、単純性、オートメーションおよび放射能の不在という商業的の要によるものである。均質系の検定法群はいくつかのタイプ、すなわち(1) 比濁分析、(2) 粒子数測定、(3) 蛍光消光、(4) 蛍光偏光および(5) 酵素検定法からなるものである。

【0004】免疫反応を定量化するために光分散を測定する最初の比濁計は、1960年代後半に考案された。これらの初期の比濁計は、新しい化学をもって10年後に改良され、分散角を計測するための角度を下げる反応物

を混合した後の最初の数秒間の間の抗原-抗体反応速度を計測できるようになった。(ライチエ、アルパーおよびグレーブス, 1969年, アルスリティス リューム. 12: 693; ディートンら, 1976年, クリン. ケム. 22: 1465 [Ritchie, Alper and Graves, 1969, *Arthritis Rheum.* 12: 693; Deaton et al., 1976, *Clin. Chem.* 22: 1465])。これらの検定法は極めて感受性に貧しくして例えれば血清 Ig E, Ig A および Ig M レベルのような、 $10^{-8} M$ よりも大きい濃度の検体の測定に適用できるものである。均質系の粒子数測定検定法においては、直径 $0.8 \mu m$ のポリスチレン粒子(ラテックス粒子)が抗体により被覆される。抗原濃度は、非凝集粒子に対して凝集粒子を識別し得る装置によって測定されるような凝集したラテックス粒子の濃度により決定され得る(カンピアソラ, 1977年, ジェイ. イムノル. メソ. 18: 33 [Cambiaso et al., 1977, *J. Immunol. Meth.* 18: 33])。均質系の蛍光消光検定法は、抗原か抗体のいずれかを蛍光体で標識する。検体-抗体-蛍光体複合体は、抗原-蛍光体あるいは抗体-蛍光体のみのものと比較して著しくより低い蛍光を発する(ウルマンら, 1979年, ジェイ. バイオル. ケム. 251: 4172 [Ullman et al., 1979, *J. Biol. Chem.* 251: 4172], 米国特許第3,998,943号; 同第3,996,345号; 同第4,174,384号; 同第4,161,515号; 同第4,208,479号および同第4,160,016号)。これらのすべての検定法は、消光の量が試料中の未知の検体あるいは抗体の量に関連するような蛍光を消光する種々の方法を含むものである。これらの検定法は低い感受性のものである($10^{-10} M$ よりも大きな流体濃度での検体)。この低い感受性は、内因性血清蛍光および静的な非酵素的拡大様式における蛍光の使用によるものである。蛍光偏光検定法は、抗原-蛍光体に結合する抗体によって顕著に減少する溶液における抗体-蛍光体の自由回転に基づくものであり、そして低分子量(分子量1000ダルトン以下)検体で重要な商業的の成功を見いだしている(ダンドリカーら, 1973年, イムノケミストリー10:219 [Dandliker et al., 1973, *Immunochemistry* 10:219])。

【0005】種々の免疫検定法はそれぞれ商業的利点および欠点を有している。RIAは感受性がありかつ設定が容易であるが、放射能、分離段階および高価な器械使用を必要とする。酵素あるいは蛍光体を用いての不均質系の検定法は、放射能およびいくつかの器械使用をなくすものであるが、分離段階を必要とする。商業的見地からは、いくつかの理由のために分離段階をなくすことが望ましい。分離は、(1) 徹底的な仕事であり、(2) 時間浪費であり、(3) 付加的な装備を必要とし、(4) 結果のばらつきを増加し、そして(5) 高いレベルのオートメーションを妨げるものである。均質系の免疫検定法の多くの商業的利点にもかかわらず、わずかに3つ、すなわちルーベンスティンら[Rubenstein et al.]、米国特許第3,817,837号の酵素標識系、バードら, 1977年, クリ

ン. ケム. 23: 1402 [Burd et al., 1977, Clin. Chem. 23: 1402] の基質標識系、および螢光偏光 (ダンドリカーら, 1973年, イムノケミストリー [Dandliker et al., 1973, Immunochemistry]) が商業的成功を見出しているにすぎない。しかもなお、これらの3つの検定系は、小さな分子量 (1000以下) の検体に限定されそして検体は 10^{-10} M よりも大きな濃度において見出される。

【0006】酵素免疫検定系について

酵素免疫検定法は、非常に好首尾なタイプの均質系の免疫検定法である。均質系の酵素免疫検定法のいくつかの別形態が、商業的成功を見出しており、(1) 酵素標識検体系と(2) 基質標識検体系である。酵素標識検体系においては、標識の酵素活性は、特異的抗体が検体-酵素複合体を結合した場合に減少される。計測されるべき検体は、定められた量の検体に関して定められた量の特異的抗体と競合する。酵素活性は、未知の検体濃度に正比例する。以下の特許はこの免疫検定系に基づいて発行された: 米国特許第3,817,837号; 同第3,852,157号; 同第3,875,011号; 同第3,966,556号; 同第3,905,871号; 同第4,065,354号; 同第4,043,872号; 同第4,040,907号; 同第4,039,385号; 同第4,046,636号; 同第4,067,774号; 同第4,191,613号および同第4,171,244号。

この技術の商業化は、低分子量検体および低感受性に限定されている (10^{-10} M より大きな濃度での分子量100ダルトンより小さな検体)。

【0007】基質標識螢光免疫検定法は、酵素に関して螢光発生性の基質への検体の共有結合を含むものである。この検体-基質結合体は、螢光性ではない。抗体の不在下においては、検体-螢光発生性基質は酵素により加水分解され螢光性分子種をもたらす。特異的抗体の存在下においては、酵素による基質への接近は縮小され、低減された螢光をもたらす (バードら, 1977年, クリン. ケム. 23: 1402; バードら, アナル. バイオケム. 77: 56; ならびにコーエン, ホランダーおよびボグノラスキー, 1979年, ジェイ. ステロイドバイオケム. 11: 161 [Burd et al., 1977, Clin. Chem. 23: 1402; Burd et al., Aual. Biochem. 77: 56; and Kohen, Hollander and Bognolaski, 1979, J. Steroid Biochem. 11: 161])。この検定系の商業化は、立体的考慮に帰因して低分子量検体に限定され、そして上記螢光消光検定法に関するものと同一の考慮に帰因して 10^{-10} M より大きな液体における濃度での検体に限定されるものであった。

【0008】限定された商業化に対抗した数多くの均質系の酵素免疫検定法が述べられてきている。

【0009】米国特許第4,134,792号は、標識として酵素阻害剤あるいはアロステリックエフェクターなどのような酵素モジュレーターを利用する免疫検定技術を述べている。特異的抗体が酵素モジュレーター標識検体に結合した場合、酵素モジュレーターはもはや酵素の活性を阻害することができない。これゆえ遊離検体による酵素

モジュレーター標識検体の競合は、酵素モジュレーターの阻害を回復させる。この分野におけるその他の特許には、米国特許第3,935,074号; 同第4,130,462号; 同第4,160,645号および同第4,193,983号が含まれる。

【0010】米国特許第4,213,893号および同第4,318,983号は、補因子-アポ酵素系を用いる酵素免疫検定法を述べている。特に、ホーンバイラ [Hornby et al.] に対して発行された米国特許第4,318,983号 (1982年3月9日) は、フラビニアデニンジヌクレオチド (FAD)

10 D) 標識された結合体とFADが補欠分子族として作用するアポ酵素を用いる方法を述べている。コリコラ [Corrino et al.] に対して発行された米国特許第4,213,893号 (1980年7月22日) は、ホーンバイラの方法において使用するのに適した、例えばFAD標識チロキシンなどのような特定のFAD標識結合体を述べている。FAD

15 標識結合体は、このような結合体の触媒活性のためにFADを必要とするアポ酵素とのインキュベーションにより発生するホロ酵素活性を計測することにより監視される。検体は、標識された補因子が脱水素酵素とのそれの反応性を維持するように、FADに共有結合される。脱水素酵素活性によって形成される還元FADの量は、検体に関して特異的な抗体の存在下において減少される。

20 還元FADの螢光定量的に監視された出現は、検体の量に正比例するものである (コーエンら, 1978年, ホルモンと薬剤に関する酵素標識免疫検定法, エス. ピー. パル編, ウォルター デギター, ベルリン アンドニューヨーク, 第67~79頁中 [Kohen et al., 1978, in Enzyme-labeled Immunoassay for Hormones and Drugs, S. B. Pal, ed., Walter deGruyter, Berlin and New York, pp. 67-79])。乳酸脱水素酵素およびジアホラーゼを用いるビオチンおよび2,4-ジニトロフルオロベンゼン検体に関する同様の系が述べられている (キャリコラ, 1976年, アナル. バイオケム. 72: 271 [Carrico et al., 1976, Anal. Biochem. 72: 271])。いずれの系も、分析される血清試料中に一般に存在する内因性の補因子および酵素からの干渉にならざるものである。

25 【0011】いくつかの酵素がペプチドフラグメントから再形成されることが、観察されてきているが、例えば、リボヌクレアーゼA (リチャードとビサヤシル, 1959年, ジェイ. バイオル. ケム. 249: 1459 [Richards and Vithayathil, 1959, J. Biol. Chem. 249: 1459])、ブドウ球菌のヌクレアーゼ (ライトら, 1974年, ジェイ. バイオル. ケム. 249: 2285 [Light et al., 1974, J. Biol. Chem. 249: 2285]) および β -ガラクトシダーゼ

30 (ラングレイとズィアビン, 1976年, バイオケミストリー 15: 4866 [Langley and Zabin, 1976, Biochemistry 15: 4866]) を含むほんのわずかのものしか酵素活性を回復していない。ウシ脾臓のリボヌクレアーゼのズブチリシンによるタンパク質分解は、2つの成分、すなわちペプチド (S-ペプチド) とタンパク質 (S-タンパク質) を

産する。S-ペプチドとS-タンパク質のいずれも単独では、評価し得るリボヌクレアーゼ活性を示さない。これらの成分が、等モルにおいて混合された場合、ほとんど完全な酵素活性が回復される。S-ペプチドとS-タンパク質は $K_{eq} = 5 \times 10^{-9} M$ を有して非常に迅速にかつ強力に再結合する（リチャードとビサヤシル、1959年、上記）。ブドウ球菌のヌクレアーゼは不活性なペプチドフラグメントからの生物学的に活性な酵素の再構築を示す。完全な149アミノ酸ブドウ球菌のヌクレアーゼ構造のアミノ酸6～48番を含むヌクレアーゼ-T-（6～48）[Nuclease-T-(6-48)]は、ヌクレアーゼ-T-（50～149）[Nuclease-T-（50～149）]と再結合し、温度変化性のほとんどない0.03～0.05/sの一次速度定数をもつ活性なヌクレアーゼ-T1を形成する（ライト、上記）。より詳細に下記で述べるように（「相補性と β -ガラクトシダーゼ」の節）、エシェリキア・コリ[E. coli]の欠失突然変異体からのポリペプチドフラグメント（例えばM15）は、熱的処理あるいは臭化シアン処理された β -ガラクトシダーゼ酵素から誘導された小さなペプチドフラグメントと組合された場合に酵素活性を回復するものであることが知られている。一方の臭化シアンで生成したフラグメントはCNBr2と呼ばれ、他方はCNBr24と呼ばれる。

【0012】より最近になって、このようなポリペプチドフラグメントの再結合に基づく免疫検定法が、ファリナとゴルケ [Farina and Golke] (1983年3月29日発行の米国特許第4,378,428号) によって、またゴネリら[Gonelli et al.] (1981年、バイオケム. アンド バイオフィズ. レス. コミュニ. 102: 917～923[1981, Biochem. and Biophys. Res. Commun., 102: 917-923]) によって述べられた。これらの中に開示されたすべての実験的な例は、リボヌクレアーゼ触媒活性を発生するためのS-ペプチド/S-タンパク質の再結合に基づくものであった。1つの検体がリボヌクレアーゼの小さなズブチリシン開裂ペプチド、すなわちS-ペプチド（アミノ酸1～20）に共有結合的に付着された。これは1つの検体と共にされ、そして活性なリボヌクレアーゼを再形成するためにS-タンパク質（アミノ酸21～124）と組合される。この検体に特異的な抗体はリボヌクレアーゼ活性の再形成を阻害する。この検定法はすべてのオートクレーブ滅菌されていない生物学的溶液における内因性リボヌクレアーゼ活性の存在により限定されるものである。

【0013】この系によって決して応対されないその他の同様な深刻な欠点としては、連結されるポリペプチドの平衡定数を調整することの不可能性、および高分子量タンパク質に結合し得る一方、活性な酵素を再形成を行ない得る免疫反応性のポリペプチドを作製することの不可能性が挙げられる。利用されるすべてのポリペプチドは活性なリボヌクレアーゼを形成するために再結合し

得る新規でない触媒的に不活性なポリペプチドであった。

【0014】CNBr2あるいはM15に1つの検体を付着させるためのファリナとゴルケ [Farina and Golke]

（米国特許第4,378,428号）によって提唱された化学的作用でのより顕著な欠点が発見されている。試験されたすべての場合において、いずれかのポリペプチド上の有効なNH₂、COOHおよびSH基を介しての検体の付着によって、相補し得ないペプチドが生じた。多くのア

ミノ、カルボン酸およびスルフヒドリル官能性を有するM15をカッピングすることによって、すべての場合において（慎重に制御された条件ですら）M15が不活性化された。動力学は、活性を不活性にするのに十分である単一ヒットを示す。CNBr2は内部のリシンを含んでおらず、1つの非反復の[unique]スルフヒドリル基および数個のカルボン酸基を含んでいる。ラングレー[Langley]との一致（“ β -ガラクトシダーゼ α -相補性の分子状態”と題された工学博士論文、ユーシーエルエイ、1975年[Ph. D. thesis entitled "The Molecular Nature of β -galactosidase α -complementation", UCLA, 1975]）において、N-末端 α -アミノ基へのカッピングによってCNBr2の相補性活性が不活性化される。CNBr2の調製（ラングレー、フォウラーおよびゼビン、1975年、ジェイ. バイオル. ケム. 250: 2587[Langley, Fowler and Zabin, 1975, J. Biol. Chem. 250: 2587]）において、第76位のスルフヒドリルは、臭化シアン開裂に先立ち、還元されそしてヨード酢酸でアルキル化された。このスルフヒドリルがアルキル化されないと、CNBr2活性は精製の段階の初期には維持され得るが、均質性へと精製する前に失活する。また、このスルフヒドリルが、ヨード酢酸の代わりに検体のマレイミド誘導体でアルキル化されるとすると、結合体の不溶性が精製をさまたげる。最後に、試験されたすべての場合において、CNBr2のCOOH部分へのカッピングによって、相補性活性が不活性化された。それゆえ、適当な免疫反応性で相補する試薬を調製するためにCNBr2およびM15を使用することは困難なことであると思われる。

【0015】相補性と β -ガラクトシダーゼについて
40 酵素 β -ガラクトシダーゼは、酵素結合イムノソルベント検定法(ELISA)（エングバールとペールマン、1971年、イムノケミストリー 8: 871[Engvall and Perlmann, 1971, Immunochemistry 8: 871]）および均質系の基質標識検定法（バードら、1977年、クリン. ケム. 23: 1402[Burd et al., 1977, Clin. Chem. 23: 1402]）において広範な使用を見出されている。加えて、 β -ガラクトシダーゼは、DNAクローニングおよびDNA配列に関する普及した遺伝子系の基礎を形成する（メッシング、1983年、メッシング イン エンザイモロジイ 101: 20[Messing, 1983, Method in Enzymology 101: 20]）。

【0016】 β -ガラクトシダーゼは、54,000ダルトンに等しい分子量(MW)を有する四量体タンパク質である。4つの同一のモノマーは1021アミノ酸からなり、それぞれ116,000ダルトンのMWを有する。図1に示すような単量体タンパク質は、3つの領域、すなわち(1)N-末端近位セグメント(α -領域)、(2)中間領域、および(3)C-末端遠位セグメント(ω -領域)に分けられる。

【0017】 β -ガラクトシダーゼから誘導された変異体ポリペプチドは、適當な β -ガラクトシダーゼネガティブ変異体の抽出物に添加された場合、相補し得るあるいは酵素活性を自発的に回復し得るものとして知られている。この現象は、シストロン内相補[intracistronic complementation]として知られる。 α -相補性の一例は、M15/CNB r 2相補系によって提供される。M15変異ポリペプチドは β -ガラクトシダーゼのアミノ酸11~41番を欠いており、そして溶液中において酵素的に不活性な二量体として存在する。臭化シアン(CNB r)開裂により β -ガラクトシダーゼから誘導されたポリペプチドは、アミノ酸3~92番から成るものである。CNB r 2は、二量体M15と混合された場合、完全な酵素活性を有する β -ガラクトシダーゼ四量体の自発的再構築を促進する(ラングレーとゼアビン, 1976年, バイオケミストリー 15: 4866[Langley and Zabin, 1976, Biochemistry 15: 4866])。M15ペプチドは α -アクセプター(α -受容体)として知られており、またCNB r 2は、 α -ドナー(α -供与体)として知られている。このことは、十分に研究された相補系を表わしている一方、CNB r 2は β -ガラクトシダーゼ中のアミノ酸23~31番の欠失変異体であるM112二量体に関する α -ドナーとして与えられ得る(リン、ビラレジョおよびゼアビン, 1970年, バイオケム. バイオフィズ. レス. コモン. 40: 249; セレダとゼアビン, 1979年, バイオケム. 18: 404; ウエルフィー, フォウラーとゼアビン, 1981年, ジェイ. バイオル. ケム. 256: 6804; ラングレーら, 1975年, プロク. ナトル. アカド. サイ. ユーエスエイ 72: 1254[Lin, Villarejo and Zabin, 1970, Biochem. Biophys. Res. Comm. 40: 249; Celeda, and Zabin, 1979, Biochem. 18: 404; Welphy, Fowler and Zabin, 1981, J. Biol. Chem. 256: 6804; Langley et al., 1975, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 1254])。その他の α -ドナーとしては、 β -ガラクトシダーゼをオートクレーブ滅菌することにより誘導されたポリペプチドを含むものである。このペプチドは、しかしながら、今だ精製されておらずまた配列も知られていない。M15およびM112以外の α -アクセプターは述べられていない。CNB r 2によるM15の相補の例において、アミノ酸配列3~10番および42~96番は双方とも酵素的に活性な複合体において二重に存在する。

【0018】シストロン内相補はまた、 β -ガラクトシダーゼのC-末端(ω -領域)で起こる。入手できる最もよく知られた配列データは、少なくとも10個のアミノ酸、すなわち1011~1021番を欠失したX90 ω -アクセプターペプチドに関するものである。X90ペプチドは単量体として存在し、アミノ酸990~1021番から成る β -ガラクトシダーゼの臭化シアン消化産物であるCNB r 24によって相補され酵素的に活性な四量体を再形成し得るものである(ウェルフィーら, 1980年, バイオケム. バイオフィズ. レス. コモン. 93: 223[Welphy et al., 1980, Biochem. Biophys. Res. Common. 93: 223])。

【0019】B型肝炎ウィルス表面抗原について

B型肝炎ウィルス(HBV)からのDNAはクローニングされており、そしてプラスミドあるいは λ 類縁ファージ(ラムドライドファージ)ベクターに連結された後に一連のフラグメントとしておよび完全な鎖状分子としてエシェリキア・コリ中において増殖されている(バーレルら, 1979年, ネイチャー(ロンドン) 279: 43~47; チャルネイら, 1979年, プロク. ナトル. アカド. サイ. ユーエスエイ 76: 2222~2226; シニンスキーラ, 1979年, ネイチャー(ロンドン) 279: 346~468[Burrell et al., 1979, Nature(London) 279: 43-47; Charnay et al., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 2222-2226; Sninsky et al., 1979, Nature(London) 279: 346-468])。続いて、HBVの表面抗原(HBV-S Ag)がクローニングされ、そしてエシェリキア・コリにおいて(マッケイら, 1981年, プロク. ナトル. アカド. サイ. ユーエスエイ 78: 4510~4514[Mckay et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 4510-4514])、酵母において(バレンゼーラ, 1982年, ネイチャー 298: 347[Valenzuela et al., 1982, Nature 298: 347])、および哺乳動物細胞において(デュボイスら, 1980年, プロク. ナトル. アカド. サイ. ユーエスエイ 77: 4549~4553[Dubois et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4549-4553])発現されている。

【0020】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、高い(10^{-15} M)感受性において、高分子量および低分子量(分子量150~30,000ダルトン)の双方の検体の定量的分析のための酵素相補性検定に使用する酵素ドナー α -ペプチドおよび酵素アクセプターポリペプチドを提供することである。

【0021】

【課題を解決するための手段】上記諸目的は、(1)酵素ドナーがスルフヒドリル、アミノおよびカルボキシル基から成る群から選ばれた反応性基を有し、上記反応性基は活性酵素複合体を形成する酵素ドナー結合体と酵素アクセプターとの相互作用によるまたは酵素ドナー結合体の検体結合タンパク質および酵素アクセプターへの

競合結合によるいずれかの妨害なしに検体または検体誘導体に共有結合できるものである、酵素アクセプターとの相互作用で β -ガラクトシダーゼの活性特性を有する活性酵素複合体を形成可能な酵素ドナーポリペプチドをコードするDNA配列を有する、酵素ドナーポリペプチドにより達成される。

*

Asp Pro Ser Gly Asn Pro Tyr Gly Ile Asp Pro Thr Glu Ser Ser Pro
Gly Asn Ile Asp Pro Arg Ala Ser Ser Asn Ser Leu Ala Val Val Leu Gln
Arg Arg Asp Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Glu Leu Asn Arg Leu Ala Ala
His Pro Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Glu Glu Ala Arg Thr Asp -X-
Pro Ser Gln Gln Leu Arg Ser Leu Asn Gly Leu Glu Ser Arg Ser Ala Gly
Met Pro Leu Glu

ただし、XはCysまたはLysである。

【0023】上記諸目的はまた、(3) 酵素ドナーが図16のBamHI-SalIフラグメントからなり、さらにスルフヒドリル、アミノおよびカルボキシル基から成る群から選ばれた反応性基を有し、上記反応性基は活性酵素複合体を形成する酵素ドナー結合体と酵素アクセプターとの相互作用によるまたは酵素ドナー結合体の検体結合タンパク質および酵素アクセプターへの競合結合によるいずれかの妨害なしに検体または検体誘導体に共有結合できるものである、酵素アクセプターとの相互作用で β -ガラクトシダーゼの活性特性を有する活性酵素複合体を形成可能な酵素ドナーポリペプチドにより達成される。

【0024】上記諸目的はさらに、(4) 酵素ドナーがスルフヒドリル、アミノおよびカルボキシル基から成る群から選ばれた反応性基を有し、上記反応性基は活性酵素複合体を形成する酵素ドナー結合体と酵素アクセプターとの相互作用によるまたは酵素ドナー結合体の検体結合タンパク質および酵素アクセプターへの競合結合によるいずれかの妨害なしに検体または検体誘導体に共有結合できるものである、酵素ドナーとの相互作用で β -ガラクトシダーゼの活性特性を有する活性酵素複合体を形成可能な酵素アクセプターポリペプチドをコードするDNA配列を有する、酵素アクセプターポリペプチドにより達成される。

【0025】本発明はまた、(5) 該酵素アクセプターがEA22である前記(4)に記載の酵素アクセプターポリペプチドである。

【0026】また、上記諸目的は、(6) DNA配列の複製および発現を指示できる発現制御配列と有効に結合した(in operative association with)前記(1)、(2)または(3)に記載の酵素ドナーポリペプチドをコードするDNA配列を有する組換えベクターによっても達成される。

【0027】本発明はまた、(7) 上記ベクターがp169、またはその突然変異体、組換え体若しくは遺伝子操作による誘導体である前記(6)に記載の組換えベクターである。

* 【0022】上記諸目的はまた、(2) 酵素ドナーが下記のアミノ末端で始まるアミノ酸配列を有するものである、酵素アクセプターとの相互作用により β -ガラクトシダーゼの活性特性を有する活性酵素複合体を形成可能な酵素ドナーポリペプチドにより達成される：

【0028】また、上記諸目的は、(8) 前記(6)または(7)に記載のベクターを含む細胞によっても達成される。

【0029】さらに、上記諸目的は、(9) I V Iに寄託し、受託番号I V I 10052で指定されたエシェリキア・コリ バクテリア細胞、またはその突然変異体、組換え体若しくは遺伝子操作による誘導体によっても達成される。

【0030】さらに、上記諸目的は、(10) DNA配列の複製および発現を指示できる発現制御配列と有効に結合した(in operative association with)前記

(4)または(5)に記載の酵素アクセプターポリペプチドをコードするDNA配列を有する組換えベクターによっても達成される。

【0031】本発明はまた、(11) 上記DNAベクターがpF29、またはその突然変異体、組換え体若しくは遺伝子操作による誘導体である前記(10)に記載の組換えベクターである。本発明はさらに、(12) 上記DNAベクターがpMG22、またはその突然変異体、組換え体若しくは遺伝子操作による誘導体である前記(10)に記載の組換えベクターである。

【0032】さらに、上記諸目的は、(13) 前記(10)、(11)または(12)に記載のベクターを含む細胞によっても達成される。

【0033】さらに、上記諸目的は、(14) I V Iに寄託し、受託番号I V I 10051で指定されたエシェリキア・コリ バクテリア細胞、またはその突然変異体、組換え体若しくは誘導体によっても達成される。

【0034】さらに、上記諸目的は、(15) I V Iに寄託し、受託番号I V I 10038で指定されたエシェリキア・コリ バクテリア細胞、またはその突然変異体、組換え体若しくは誘導体によっても達成される。

【0035】

【作用】本発明によると、ポリペプチドは、組換えDNA技術によってあるいは化学的ポリペプチド合成技術によって製造される。[本明細書中で用いられる場合、"ポリペプチド"なる用語は、ペプチドとタンパク質を含めたものである。] ポリペプチドそれら自体は、酵素

的に不活性であるが、水性媒体中でいっしょに反応した場合、これらは結合し、相補性として知られる現象を介して触媒的に活性な酵素を形成する。 β -ガラクトシダーゼは、これが分光測光法および螢光定量法を用いて検知できる数個の基質を有しており、従来の商業的免疫検定法において有用性が示されており、かなり低濃度において計測可能であり、そして遺伝学的に十分特徴づけられているゆえに、好まれる酵素である。有意でないバックグラウンドから酵素活性を生成することによって、高い信号対ノイズ比が達成される。本発明の改良された検定法において用いられる新規なポリペプチドは、(a) 植体およびポリペプチドに関してコードする配列を含む組換え遺伝子の産物である、検体がポリペプチドに融合されるものである融合タンパク質；(b) 植体との最適なカップリングのために遺伝子操作されたポリペプチド；(c) 植体との最適なカップリングのために化学合成されたポリペプチド；および(d) 酸化、熱、pH、酵素分解などの環境因子に対する安定性を改良するために遺伝子操作されたあるいは化学合成されたポリペプチドを包含するものである。

【0036】これゆえ、方法は、(1) 相補可能であり、(2) 再結合の平衡定数について組織的に調整され得るものであり、(3) 特異的結合タンパク質と相互作用し得るものであり、そして(4) 特異的結合タンパク質との相互作用によって、 β -ガラクトシダーゼの活性特性を有する活性酵素の形成を制御し得るものである適当なポリペプチドを提供するための組換えDNA技術あるいは化学的ポリペプチド合成技術に基づいた免疫検定法を生み出すことに関して述べられる。

【0037】本発明の遺伝子操作されたおよび化学合成されたポリペプチドは、その他の相補する酵素系以上に独特な利点を提供する。組換えDNA技術によって製造されるポリペプチドは、低いコストで大量に生成されることができ、均質性のものに容易に精製でき、そして任意の大きさおよび配列で生成され得るものである。化学合成されるポリペプチド、特にアミノ酸長さにおいて比較的小さなものであるポリペプチドは、高い収率において、制限のない配列変化において生成され得る。いずれの調製技術も、改良されたカップリング化学特性、酵素反応動力学、酵素的検定感受性および/または安定性のポリペプチドを導く、アミノ酸配列の巧妙な操作を提供するものである。

【0038】本発明は、水性媒体中でいっしょにインキュベートされた場合に相補のプロセスによって活性な β -ガラクトシダーゼ酵素複合体を形成するものであり組換えDNA技術あるいは化学的ポリペプチド合成技術を用いて調製される酵素的に不活性なポリペプチドを用いる、種々の検体に対する改良された検定法において使用する組換えDNAベクターからなるものである。本発明によると、組換えDNA技術は、相補に必要とされる一

方のあるいは双方を調製するために用いられ得る。この2つのポリペプチドは、(1) 酵素アクセプター[enzyme-acceptor]および(2) 酵素ドナー[enzyme-donor]と呼ばれる。DNA合成技術は、種々の長さのポリペプチドに関してコードする遺伝子配列の調製に適用され得る。酵素ドナーおよび酵素アクセプターは、それらの技術によって調製される。化学的ポリペプチド合成技術は、アミノ酸長さが比較的短いポリペプチドの調製に通常適用される。この理由ゆえ、化学的技術は、 β -ガラクトシダーゼ系の酵素ドナーの合成に最も適したものであり、これはこの系の酵素ドナーは、酵素アクセプターに比較してアミノ酸配列において主として短いものであるからである。もちろん、これは、ペプチド合成技術によって、機能的な酵素-アクセプターが調製できないということではない。

【0039】本明細書において定義されるように、酵素アクセプターは、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子の欠失変異体によって生成された酵素的に不活性なポリペプチドであって、酵素ドナーと組合された場合に相補のプロセスによって活性な β -ガラクトシダーゼを形成し得るものである。本明細書において構成されたすべての酵素アクセプターは、 β -ガラクトシダーゼタンパク質のN-末端をコード化する β -ガラクトシダーゼ遺伝子の α -領域においての欠失である。これらの酵素アクセプターのいくつかは、より高い安定性を与えるために、曝れたシステイン残基の除去を介してさらに操作されている。

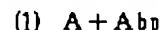
【0040】本明細書において定義されるように、酵素ドナーは、2つのドメイン、すなわち(1) 活性な酵素を形成するために酵素アクセプターと組合せられ得るタンパク質配列を含む α -ドナードメインと(2) 植体結合タンパク質[analyte-bindingprotein]と相互作用し得る検体ドメインから成る酵素的に不活性なポリペプチドである。検体ドメインは、(1) 植体カップリングドメインあるいは(2) タンパク質ドメインのいずれかである。

【0041】本明細書において定義されるように、検体カップリングドメインは、検体の共有結合のために都合のよい部位を提供するためにポリペプチド中に挿入あるいは置換されたアミノ酸で構成される。この化学的なカップリング部位は、最も頻繁には、シスチンあるいはリシン残基に関連するスルフヒドリルあるいはアミノ基であるが、(a) 相補のプロセスあるいは(b) 植体の検体結合タンパク質との相互作用によって干渉されることなく検体に結合し得る任意のアミノ酸の任意の適当な化学的反応性基であり得る。化学的反応性基の位置は、検定法の立体障害要求に合致するように変えられ得る。

【0042】本明細書において定義されるように、タンパク質ドメインは、タンパク質抗原あるいは抗原の免疫反応性基(エピトープ)からなるものである。例えば、腫瘍性、細菌性、真菌性、ウィルス性、寄生性、マイコプラズマ性、組織適合性、分化およびその他の細胞膜

抗原類、病原体表面抗原、毒素類、アレルゲン類、薬剤類ならびに、ゴナドトロピンホルモン、卵胞成熟ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、フェリチンもしくは検体に相当するあるいは類似する任意のその他の抗原性分子を含む（もちろんこれらに限定されるわけではない。）任意の生物学的に活性な分子などのような抗原が、可能なものである。本明細書において定義されるように、検体ドメインがタンパク質ドメインである酵素ドナーはまた“融合タンパク質”と呼ばれる。遺伝子工学によって構築されたすべての酵素ドナーが、 α -ドナードメインと検体ドメインを有する融合タンパク質をコード化する遺伝子融合を表わすものであるが、本明細書において定義されるような“融合タンパク質”なる用語は、 α -ドナードメインとタンパク質抗原の免疫反応性エピトープを特異化するタンパク質ドメインとから構成されるものみに適用できるものである。〔もちろん、タンパク質ドメインに関して、ある抗体以外のある検体結合タンパク質と相互作用し得る非免疫反応性タンパク質あるいはそのフラグメントから成ることは可能である。〕融合タンパク質のタンパク質ドメインは、検体ドメインが検体カッピングドメインであるものにおいては必要であるような、検体ドメインへの検体の共有結合の必要性を除去するものである。これは、融合タンパク質のタンパク質ドメイン部分が、本質的に、検体結合タンパク質に関して遊離検体と競合し得る検体（あるいは、少なくともその近類似体）であるゆえである。

【0043】試料あるいは媒体中に含まれる検体に対する任意の酵素検定法におけるように、検定混合物中に試薬として含まれる検体結合タンパク質は、遊離検体および、酵素ドナーの検体ドメインにカッピングしたあるいは検体ドメインの一部として融合した検体の双方と、競合的に相互作用するあるいは組合せするものでなければならない。酵素ドナーにカッピングしたあるいは酵素ドナー中に融合した検体（以下“酵素ドナー結合体[enzyme-donor conjugate]”と呼ぶ）との検体結合タンパク質の相互作用は、酵素ドナーと酵素アクセプターとの相補のプロセスを阻止するものでなければならない。本*



式中 K_{2a} および K_{2d} は、酵素ドナー結合体と検体結合タンパク質の会合および解離の定数を表わすものである。

【0047】

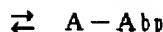
*明細書において定義されるように、検体結合タンパク質は、従来の（多クローニ性）および単クローニ性抗体（およびそのフラグメント）を含む特異的抗体分子、レセプター、輸送タンパク質、レクチン、ならびにアビジン、チロキシン結合グロブリンなどを含む（もちろんこれらに限定されるわけではない。）その他の結合タンパク質を含むものである。本明細書において定義されるように、検体結合タンパク質なる用語は、糖タンパク質、リボタンパク質などのようなタンパク質様物質を包含するものである。

【0044】本発明による改良された酵素検定法は、競合的結合機構に基づくものである。本発明によると、カッピングされたまたは融合された関心の検体（あるいは類似検体誘導体）からなる β -ガラクトシダーゼ系の酵素ドナー（すなわち酵素ドナー結合体）の既知量が、特異的検体結合タンパク質の既知量および酵素ドナーと相補し得る酵素アクセプターの既知量を合せたものである。特異的検体結合タンパク質の既知量に対する試料中の酵素ドナー結合体の検体ドメインと遊離未知検体との競合によって、酵素ドナー結合体は酵素アクセプターに結合するように遊離する。酵素ドナー結合体と酵素アクセプターとの会合[association]は、触媒的に活性な酵素複合体の形成をもたらし、これゆえ、試料中に検知できる β -ガラクトシダーゼ酵素活性が監視される。結果的に、試料中の遊離検体の量は、計測可能な酵素活性の正比例関数として決定される。酵素活性は、酵素触媒反応による基質転化の速度を、分光測光法および蛍光定量法などを含む（もちろんこれらに限定されるわけではない。）種々の技術の任意なものによって監視することにより計測される。本発明の検定法の競合的反応は以下の反応式(1)～(3)で表わされる。

【0045】なお、以下の反応式(1)～(3)において、検体、酵素-ドナー結合体、酵素アクセプター、検体結合タンパク質、および β -ガラクトシダーゼ酵素はそれぞれA；ED～A；EA；AbpおよびEで表わされる。

【0046】

【化1】



【化2】

 K_{3d}

式中、 K_{3a} および K_{3d} は、酵素ドナー結合体と酵素アクセプター
ポリペプチドとの会合および解離の定数を表わすものである。

【0048】検体結合タンパク質 (Abp) の酵素ドナー結合体 (ED~A) 上の接近可能な決定基への結合は、酵素アクセプターが不活性な二量体をとどめるように相補性反応を阻害する。

【0049】これゆえ以下の式の反応式(2) は、以下の反応式(3) と競合する。

【0050】

【化3】



【0051】

【化4】



* 【化5】

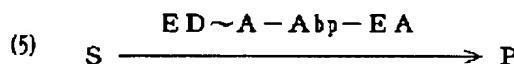


10 * 【0052】Abp、ED、A および EA の既知量を用い

ると、複合される β -ガラクトシダーゼ [E] の活性は、試料中の関心の遊離検体の未知濃度に正比例するであろう。

【0053】従来の酵素検定法におけると同様に、十分な感受性のためには、検体結合タンパク質にカップリングした酵素ドナー結合体の酵素-アクセプターとの相補による活性な酵素の形成が最小限なものとされなければならない。言い換えれば、以下の反応式(4) および(5) のいずれかあるいは双方は、わずかに最小限で進行するあるいは全く進行しないものでなければならない。

【0054】



式中、ED~A ; Abp および EA は上記と同様のものであり、
また活性な酵素 (E) により触媒される反応に関する基質および
産物はそれぞれ S および P で表わされる。

【0055】十分な感受性を有する特別な検定法を設計するための臨界成分は、(1) 酵素ドナー結合体および酵素-アクセプターに関する会合定数 (K_{3a}) ; (2) 特異的検体結合タンパク質の濃度 ($[Abp]$) ; (3) 特異的検体結合タンパク質および酵素ドナー結合体に関する会合定数 (K_{2a}) ; ならびに酵素アクセプターの濃度 ($[EA]$) の間の関係である。

※

$$\frac{K_3 [Abp]}{K_1} \cong [EA] \cong [ED \sim A] + K_3$$

式中、 K_1 および K_3 は反応(1) および(3) に関する平衡定数を表わし、また $[Abp]$ 、 $[EA]$ および $[ED \sim A]$ はそれぞれ、検体結合タンパク質、酵素アクセプターの濃度および検体にカップリングした酵素ドナーの濃度である。この分析は、上記反応(1) および(2) に関する平衡定数は同一であることおよび反応(4) および(5) は全く進行しないことを仮定する。

【0058】ファリナとゴルケ (上記) によってより詳細に説明されるように、式 $K_3 [Abp] / K_1$ が $[E A]$ よりも約 2~100 倍、好ましくは約 5~25 倍大

※ 【0056】ファリナとゴルケ [Farina and Golke] (米国特許第4,378,428 号) によって提唱された次の不等式は、特別の検定法を設計することにおける指針として用いられ得る。

【0057】

【化6】

※

きいものであるよう、検定が設計されることが通常望ましい。さらに ED~A の濃度は、予想される未知の検体濃度のものの約 10~100 倍の因子にあるべきであ

る。これは、検定されるべき試料中における変化する検体濃度に対して満足に応答する、反応(3)において形成される触媒的に活性な酵素の量をもたらすものである。

【0059】本発明による酵素相補性検定法の成分は、水性媒体あるいは凍結乾燥形態のいずれかにおけるキット中に包装され得る。それぞれの成分ないしは試薬は、別々に、または検定の感受性が変化されずかつ成分が悪影響を及ぼされない限りにおいて他方の成分といっしょに包装され得る。このキットの1つの商業的実施態様は、クローニング酵素ドナー免疫検定法[Cloned Enzyme-D oner Immunoassay][CEDIA™]と呼ばれる。

【0060】酵素ドナー

本発明によると、改良された酵素検定法は、組換えDNA技術および/または化学的ポリペプチド合成技術を用いて調製された酵素ドナーおよび酵素アクセプターの使用により達成される。このような技術は、適当な反応性基、例えばアミノ、スルフヒドリル、カルボキシルなどを有するアミノ酸の挿入あるいは置換により、酵素ドナーと検体の間の共有結合に関する改良された化学特性をもたらすものである。このような技術は、相補にするポリペプチドのアミノ酸配列を組織的に決定することにより、酵素アクセプターと酵素ドナーとの間の会合定数のより正確な制御をもたらすものである。さらに、このような技術は、これらのポリペプチドの低価格で確かな源を産出するものである。

【0061】酵素ドナー：改良されたカップリング化学特性

本発明の1つの実施態様によると、1つの α -ドナードメインと1つの検体ドメインを有する酵素ドナーは、検体を検体ドメインへカップリングさせるための化学特性を改良するために、組換えDNA技術の使用によって調製される。これらの酵素ドナーポリペプチドは、相補に必要とされる α -ドナードメイン配列から変化される距離で、検体の共有結合的付着のための都合のよいカップリング部位を提供する。

【0062】1つの検体カップリングドメインを含有するタイプの酵素ドナーポリペプチドを得るために、当業者に公知であるプラスミドpUC13(図2A参照)が、種々の酵素を用いて α -領域中の異なる部位で開裂され得る。例えば、HaeI I、BglI、MstIあるいはPvuIでの開裂は、H-シリーズ、B-シリーズ、M-シリーズおよびP-シリーズ α -領域をそれぞれ生じる。B-シリーズおよびH-シリーズはT4-DNAポリメラーゼおよびS1ヌクレアーゼで処理される。M-シリーズとP-シリーズは処理されない。DNAのそれぞれのシリーズは、多重クローニング部位においてSacIで消化され、そして α -相補ペプチドをコードする小さなDNAはアガロースゲル精製により精製され、DEAE-セルロース紙上に電気泳動され、溶出されそしてエタノール沈澱される。

(11) 20

【0063】さらに、プラスミドを遺伝子操作し、温度誘発性プロモーター[temperature inducible promoter]の調節[regulatory control]下に α -ドナー配列を置く。これは、温度感受性であり、タンパク質発現の温度誘発を準備する1つの λ リプレッサータンパク質(λ C I遺伝子によってコードされた)と組合せて、1つの λ Prプロモーターを用いて達成され得る。 λ 変異体遺伝子C I 857は、37°Cより高い温度で不活性である温度感受性リプレッサータンパク質に関してコードするものである。以下、 λ C I遺伝子に関するものはC I 857変異体遺伝子と言及する。

【0064】本発明の他の実施態様によると、1つの α -ドナードメインと1つの検体ドメインを有する酵素ドナーは、検体を検体ドメインにカップリングするための化学特性を改良するために、化学的ポリペプチド合成技術の使用によって調製される。これらの酵素ドナーポリペプチドは、相補に必要とされる α -ドナードメイン配列から変化される距離で、検体の共有結合的付着のための都合のよいカップリング部位を提供する。化学的ポリペプチド合成技術はまた、 α -ドメインおよびタンパク質ドメインからなる酵素ドナーを調製するために用いられ得る。酵素ドナーペプチドは、標準合成技術によって自動化ペプチド合成器において合成される。簡単に述べると、所望のペプチドのカルボキシ末端アミノ酸を表わす保護されたアミノ酸が架橋ポリスチレンビーズに付着される。この樹脂ビーズは、付加的なアミノ酸が、段階的様式においてカップリングされ得る固相として機能する。ペプチドは、カルボキシ末端からN-末端へ連続的に鎖を成長させることによって生成される。固相は、反応を迅速に100%完了に導くことを、過剰な試薬を用いることによって容易とする。過剰な試薬は、次に容易に洗浄除去され得る。合成段階の完了時に、ペプチドは樹脂より除去されそして精製される。

【0065】本発明の方法により調製される酵素ドナーペプチドは、CNBr2/M15、CNBr/M112およびCNBr24/X90相補系の従来のポリペプチドより、検体に対する付着に関する優れたカップリング化学特性を有するものである。

【0066】多くのアミノ、カルボキシルおよびスルフヒドリル基を有するM15への検体のカップリングは、すべての場合において(十分に制御された条件においてすら)、M15を不活性とした。動力学実験は、活性を不活性とするのに十分である単一ヒットを示している。同様の結果がM119およびX90でも期待されるものであった。

【0067】試験されたすべての場合において、NH₂、COOHおよびSH基を介してCNBr2ペプチドへの検体の共有結合的付着は、相補し得ないポリペプチドをもたらしたCNBr2は、内部のリシンを含んでおらず(有効なNH₂基がない)、1つの非反復のスル

フヒドリル基および数個のカルボキシル酸基を含んでいた。最初に、ラングレーとの一致（“ β -ガラクトシダーゼ α -相補性の分子状態”と題された工学博士論文、UCLA、1975年）において、N-末端 α -アミノ基へのカップリングは、CNBr 2の相補活性を不活性化することが示されている。一連の実験において、異なる分子量の化合物のいくつかが、CNBr 2ペプチドのN-末端に位置する單一アミノ基に共有結合的に付着した。以下の化合物は、このペプチドのN-末端アミノ基と反応した：無水コハク酸（MW 100ダルトン）；ビオチン-N-ヒドロキシスクシンイミド エステル（MW 342ダルトン）；4-フェニルスピロ[フラン-2(3H)-, -1'-フタロン]-3,3'-ジオン（フルオレサミン）（MW 278ダルトン）；およびジクロロトリアジニルアミノフルオロセイン-ジヒドロクロライド（MW 568ダルトン）。これらの酵素ドナー結合体による相補は、遊離CNBr 2ペプチドによる相補と比較された。M15あるいはEA23酵素アクセプターのいずれかを相補するCNBr 2の能力は、付着した化合物によってそれぞれ約25%、39%、46%および63%阻害された。組み換えDNA技術によって調製された酵素ドナーポリペプチドのN-末端アミノ基へのこれらの同様の化合物の類似の共有結合的付着は、相補を同様に阻害したことについて注意すべきである。これゆえ、検体、特に約500ダルトンより大きな分子量の検体のN-末端のアミノ基へのカップリングは、酵素-ドナーポリペプチドによる相補をかなり制限するものである。

【0068】第二に、精製されたCNBr 2ペプチドにおいては、検体の共有結合的付着のために有効な遊離スルフヒドリル基がない。CNBr 2の調製（ラングレー、フォウラーおよびゼビン、1975年、ジェイ・バイオル、ケム. 250: 2587[Langley, Fowler and Zabin, 1975, J. Biol. Chem. 250: 2587]）において、第76位のスルフヒドリルは、臭化シアンによる開裂に先立ち、還元されそしてヨード酢酸でアルキル化される。このスルフヒドリルがアルキル化されないと、CNBr 2活性は、精製の段階の初期には維持され得るが、均質性への精製の前に失われる。また、このスルフヒドリルがヨード酢酸の代わりに検体のマレイミド誘導体でアルキル化されると、結合体の不溶性が精製をさまたげる。

【0069】第三に、試験されたすべての場合において、CNBr 2のCOOH部分へのカップリングは相補性活性を不活性とした。例えば、テオフィリン-8-プロピルアミンが、水溶性カルボジイミド1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDAC、シグマケミカルカンパニー[Sigma Chemical Co.]、ミズーリー州セントルイス)を用いて、テオフィリンをCNBr 2にカップリングする試みにおいて用いられた。テオフィリン-8-プロピルチレートが、クックら[Cook et al.]

(1976年、レス・コム、ケム、パス、ファラム. 13: 497~505[1976, Res. Comm. Chem. Path. Pharm. 13: 497-505])に従い合成され、そして修正されたカーティウス[Curtius]転位（ウォッシュボーンとペーターソン、シンスティック コム. 1972年, 2(4): 227~230[Wash-borne and Peterson, Synthetic Comm. 1972, 2(4): 227-230])によってテオフィリン-8-プロピルアミンに転化された。精製された生成物の構造は、デューク ユニヴァーシティ[Duke University]でティー・バナマン博士[Dr. T. Vanaman]によって質量分析学により確認された。0.1M NaPO₄、pH 7.4の0.5ml中のCNBr 2の2 × 10⁻¹¹ molとテオフィリン-8-プロピルアミンの1 × 10⁻⁶ molを含む数本の試験管に対し、EDACの減少量が添加された。得られた相補活性は、酵素-アクセプターとしてのM15および基質としてのo-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシドを有する0.5M PM2緩衝液[PM2 Buffer]中において測定された。EDACは使用の直前に溶解され、冷水中に希釈され、種々の希釈の10μlが反応管中に添加された。1.403; 0.000; 0.000; 0.010; 0.018; 0.125; および0.983の光学濃度(414nm)がそれぞれ、0; 1 × 10⁻⁶; 1 × 10⁻⁷; 1 × 10⁻⁸; 1 × 10⁻⁹; 1 × 10⁻¹⁰; 1 × 10⁻¹¹モルのEDACの濃度を用いて計測された。これらのデータは1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドとのカップリングを試みられたCNBr 2の迅速な不活性化を示すものである。

【0070】これに対して、本発明により調製される酵素-ドナーポリペプチドは、N-末端より十分に離れたスルフヒドリル、アミノあるいはカルボキシル基を、酵素ドナー結合体の触媒的に活性な酵素複合体を酵素アクセプターと形成する能力による干渉なく検体がこれらの基に共有結合的に付着されるように、提供するために、遺伝子操作されるあるいは化学的に合成される。スルフヒドリルおよびアミノ基が好ましいものである。

【0071】遊離スルフヒドリルが存在する場合、それは検体上に存在する反応性基と反応し得る。このような反応性基としては、反応性ハロアルキル基および酸/ハロ基、p-メルクリベンゾエート基ならびにミカエル型付加反応[Michael-type addition reaction]し得る基(例えば、マレイミドや、ミトラルとラウトン、1979年、ジェイ・アメル、ケム. 101: 3097~3110[Mitral and Lawton, 1979, J. Amer. Chem. Soc. 101: 3097-3110]において述べられたタイプの基などを含む)などが含まれるが、もちろんこれらに限定されるわけではない。本明細書において定義されるように、ハロアルキルは、臭素、ヨウ素、あるいは塩素で置換された1~3個の炭素原子の任意のアルキル基からなる。検体が、酵素ドナーの遊離スルフヒドリル基に対してカップリングするためのこのような反応性基を有していない場合、検体の誘導

体が、このような反応性基を含むように調製され得る。

【0072】酵素-ドナー：融合タンパク質

本発明の他の実施態様によると、酵素ドナーポリペプチドは、 α -ドナードメインをコード化する遺伝子を、検定されるべきタンパク質検体（あるいはその一部）をコード化する他の遺伝子と、連結する[ligating]あるいは融合することにより調製される。適当な宿主細胞における連結された遺伝子の発現は、酵素アクセプターとの相補および検体結合タンパク質への特異的結合のいずれをもなし得る融合タンパク質産物をもたらす。これゆえ、本発明のこの実施態様により調製された融合タンパク質は、いずれも融合された遺伝子によりコード化された、2つのドメイン、すなわち(1) α -ドナードメインと(2) タンパク質ドメインとから成るものである。先に述べたように、本発明において利用されるタンパク質ドメインは、タンパク質抗原の免疫反応性エピトープからなるものである。

【0073】融合タンパク質をコード化する遺伝子を構築する[construct] ために、問題の2つの遺伝子は、翻訳解読枠が維持されかつ終止コドンによって不断とされるように、これらのコーディング配列と連接されなければならない。さらに、宿主がリプレッサーを含む株である場合、融合タンパク質は、誘導のリプレッサーの不活性化に対する応答してのみ産出される。融合タンパク質は、相補性活性に関して、酵素アクセプターの生体内相補 [in vivo complementation] によって同定される。免疫反応性およびタンパク質ドメインとの抗体の相互作用による相補の免疫特異性阻害に関する遺伝的構造物のスクリーニングは、試験管内的に [invitro] 行なわれる。

【0074】融合タンパク質は、免疫反応性ポリペプチドが α -ドナードメインのN-末端にあるいは酵素-ドナーポリペプチドのC-末端に付着されることで構築されることができる（図4～6参照）。 α -ドナードメインとタンパク質ドメインの間のスペーサー配列は、相補性を高めるあるいは、相補における特異的結合タンパク質との相互作用の阻害効果を高めるために用いられ得る。

【0075】さらに、特定のタンパク質検体に関してコードする完全遺伝子の融合は、必要とされないものである。例えば、関連ヒト糖タンパク質ルトロピン[leutropin]（黄体化ホルモン；LH）、フォリトロピン[follitropin]（卵胞刺激ホルモン；FSH）、チロトロピン（甲状腺刺激ホルモン；TSH）およびヒドロ性ゴナドトロピン(hCG) は α および β -サブユニットからなる。これらすべてのホルモンの α -サブユニットは同一のものである。しかしながらそれぞれの場合において、 β -サブユニットは異なっており、そしてそれぞれのホルモンの独特の特異性および生物学的活性を与えるものである。これゆえ、 β -サブユニットのみが、このグループの特定のホルモンに関して特異的な免疫検定法を構成す

るために、 α -ドナードメイン配列に融合される必要があるであろう。

【0076】あるいはまた、 α -ドナーをコードする遺伝子配列に融合されるタンパク質ドメインに関しコードする免疫反応性配列は、非反復の免疫反応性エピトープで表わされ得る。例えば hCG の β -サブユニットの独特なカルボキシ末端 30 アミノ酸延長（ビルケンら、1982年、エンドクリノロジイ 110: 1555 [Birken et al., 1982, Endocrinology 110: 1555]）が hCG に関する検定においてタンパク質ドメインとして用いられる。

【0077】その他の例示的実施例によると、完全B型肝炎ウィルス表面抗原に関する配列あるいはこの配列のほんの小さな部分が、B型肝炎ウィルスに関する免疫反応性エピトープとして用いられることができた（レーナーら、1981年、プロク. ナトル. アカド. サイ. ユーエスエイ 78: 3403 [Lernere et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Soc. USA 78: 3403]）。

【0078】酵素ドナーは、市販のDNA合成器および同様なものを用いるDNAの直接合成を含む組換えDNA技術を包含する種々の方法によって調製されることができる。

【0079】酵素アクセプター

先に述べたように、酵素ドナーと酵素アクセプターポリペプチドとの間の会合の定数は、任意の酵素相補性検定系で満足な感受性を達成するための重要なパラメーターである。本発明によると、酵素ドナーと酵素アクセプターとの間の会合の定数を調整するために、酵素ドナー α -ドメイン（上記、「酵素ドナー」参照）あるいは酵素アクセプターのいずれかのアミノ酸配列が組織的に変えられる。

【0080】酵素ドナーに対して変更された親和性を有する酵素アクセプターは、欠失体構築あるいは、所望のアミノ酸配列を有するDNAの直接合成後の天然の β -ガラクトシダーゼをコード化する lacZ 遺伝子の α -領域のDNA配列中への枠内における連結を含む（もちろんこれらに限定されるものではない。）種々の組換えDNA技術を用いて調製される。

【0081】欠失体構築による酵素アクセプターの調製に関する例示的技術は、下記において詳細に表わされる。非常に簡単にのべると欠失体構築技術は、 β -ガラクトシダーゼZ 遺伝子の α -領域中への特定の制限酵素に関して特異的な部位の導入した後、例えば Bal 3.1 消化のような部位特異的消化をし所望のアミノ酸配列を得ることを含むものである。適当な制限酵素での消化の後に、生存可能な酵素アクセプターは、生体内相補能を用いて単離される。例えば、相補は、関心の酵素ドナーならびに酵素アクセプターに関しコードする温度誘発性遺伝子を持つプラスミドを、AMA 1004 (AMA 1004 は、galU, galK, StrA^r, hsdR^r, leuB^r, trpC, △ (lac I P O Z) C 29 である。) (カ

サダバンら、1983年、メソッズインエンザイムロジイ [Casadaban et al., 1983, *Methods in Enzymology* 100:293])のような株中に形質転換し、そして誘導物質イソプロピルチオガラクトシドおよび色素産生性基質5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトピラノシドを含むプレートにおいて選択することによってスクリーニングされ得る。30°Cでは白色であるが42°Cでは青色のコロニーは、生存可能な酵素アクセプターの產生を示す。このような酵素アクセプターからのDNAはSalIで切断され、再連結されそしてAMA1004中へ形質転換される。酵素アクセプターポリペプチドは次に精製される。

【0082】あるいはまた、酵素-アクセプターは、任意の市販のDNA合成器を用いるDNAの直接合成によって調製され得る。所望の合成DNA配列は、次にアニーリングされそして適当なプラスミドベクター中へ連結される。例えば、プラスミドp150はBamH IおよびXho I制限酵素で消化される。所望の合成DNA配列は次にBamH I / Xho Iギャップ中に挿入される。

【0083】本発明の他の実施態様によると、安定性が向上した酵素アクセプターが、酵素相補性検定における使用のために調製される。酵素アクセプターの不安定性は、酸化状態によって最も顕著に影響される。エチレンジアミン四酢酸(EDTA)および2-メルカプトエタノールもしくはジチオトレイトールのような還元剤は、酵素アクセプターの安定性を劇的に改良する。これらの結果は、不安定性の原因としての酵素アクセプターにおける曝れたスルフヒドリル基を指すものである。ジョルンヴォール、ウォウラおよびゼアビン(バイオケミストリー、1978年、17:5160~5164[*Biochemistry*, 1978 17:5160-5164])によると、天然 β -ガラクトシダーゼの単量体ポリペプチド鎖の16のシステイン残基の2つが酵

10

20

30

素の表面上に位置される。しかしながら、酵素-アクセプターM15は、表面上に5つのシステイン残基を含む。これゆえ酵素アクセプターの安定性を改良するために、曝されたシステイン残基は、下記において述べられる改良された酵素-アクセプターから組織的に除去される。酵素アクセプターをコード化する遺伝子は、適当なM13バクテリオファージ中にクローニングされ、一本鎖DNAが単離されそしてザ・アプライド・バイオシステムズ・インコーポレーション[the Applied Biosystems, Inc.]DNA合成器において合成された適当なオリゴヌクレオチドプライマーにアニーリングされた。ゾラーツミス[Zoller and Smith] (メソッズ・イン・エンザイモロジイ 1983, 100, 468~500, アカデミック・プレス[*Methods in Enzymology* 1983, 100, 468-500, Academic Press])によって述べられるような標準的方法がこれらの構築において用いられる。

【0084】検体

本発明の改良された方法および新規な組成物は、薬剤、薬剤代謝産物、生物学的活性分子、ステロイド、ビタミン、産業汚染物、農薬およびそれらの代謝産物、食品添加物、除草剤およびそれらの代謝産物、風味剤および食品毒、病原体およびこれらの產生する毒素、ならびにその他の関心物質を含む種々の検体の存在および/または量を測定するために用いられることができる。例えば、約2,000ダルトンより大きな分子量を有するタンパク質のような、比較的高分子量の検体が、より小さな検体と同様に、本発明の改良された検定法および組成物を用いて検知および/または測定され得る。このような検体の例示的な例としては、表1に示されるようなものが含まれるが、これらに限定されるわけではない。

【0085】

【表1】

高分子量

癌胚抗原
フェリチン
ヒトT細胞白血病ウィルス
インスリン
 α -胎児タンパク質
風疹ウィルス
ヘルペスウィルス
サイトメガロウィルス
卵胞成熟ホルモン
甲状腺刺激ホルモン
黄体化ホルモン
肝炎ウィルス
絨毛性ゴナドトロビン
卵胞ホルモンレセプター
甲状腺刺激ホルモンレセプター
ポリオウィルスレセプター
インスリン輸送タンパク質
プロテインA
コンカナバリンAレクチン
小麦胚凝集素レクチン
分泌タンパク質
コレラ毒素
アビジン

低分子量

エストリオール
ジゴキシン
チロキシン
プロブラノロール
メトトレキセート
フェンシリジン
メサドン
モルヒネ
ジアゼバム
オキサゼバム
キニジン
プロポキシフェン
N-アセチルプロカインアミド
セコバルビタール
トプラマイシン
ゲンタマイシン
テオフィリン
アンフェタミン
ベンゾイルエクゴニン
フェニトイント
プロカインアミド
ライドカイン
カルバマゼピン
ブリミドン
バルプロイックエシッド
フェノバルビタール
エトスクシンアミド
ピオチン

【0086】酵素基質

本発明による改良された酵素検定法において、試料混合物中の未知検体の量は β -ガラクトシダーゼ酵素の活性の正比例関数として測定される。酵素活性は、酵素的に触媒された反応の産物の出現によってあるいは、酵素基質の消失によって監視される。これは、基質の転化率である。分光測光的あるいは蛍光定量的検定に適した β -ガラクトシダーゼに関する基質としては、p-アミノフェニル- β -D-ガラクトピラノシド；2'-N-(ヘキシデカノール)-N-(アミノ-4'-ニトロフェニル)- β -D-ガラクトピラノシド；4-メチルウンベルリフェリル- β -D-ガラクトピラノシド；ナフチル-AS-B1- β -D-ガラクトピラノシド；1-ナフチル- β -D-ガラクトピラノシド；2-ナフチル- β -D-ガラクトピラノシドモノハイドレート；o-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド；m-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド；p-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド；ならびにフェニル- β -D-ガラクトピラノシド、5-ブロモ-4-クロロ-3

-インドリル- β -D-ガラクトピラノシド、レソルフィン- β -D-ガラクトピラノシド、7-ヒドロキシ-4-トリフルオロメチルクマリン、 ω -ニトロスチリル- β -D-ガラクトピラノシド、およびフルオレセイン- β -D-ガラクトピラノシドなどが含まれるが、もちろんこれらに限定されるわけではない。

【0087】検体結合タンパク質

本発明による酵素検定法は、遊離検体と酵素ドナー結合体との間の検体結合タンパク質に対する競合的相互作用を利用するものである。酵素ドナー結合体の相互作用は、相補反応を阻害する。下記の実施例7および8において詳細に述べられるように、検体結合タンパク質に対して特異的な抗体あるいは抗体フラグメントの付着は、立体障害効果を高めるのに有用であり、そしてこれゆえ検体結合タンパク質に結合した酵素ドナー結合体による相補の阻害に寄与する。

【0088】本発明の1つの実施態様によると、検体結合タンパク質は、1つの抗体分子である。このような場

合においては、検定は、酵素免疫検定である。このような検定に有用な抗体分子としては、測定されるべき検体に対して特異的な従来の（多クローン性の）および単クローン性の抗体（ならびに多クローン性および単クローン性抗体のフラグメント）の双方が含まれる。

【0089】本発明の他の実施態様によると、検体結合タンパク質は、ビオチンに対して特異的親和性を有するアビジンである。このような場合においては、酵素検定は、ビオチンのみならず、アビジンに対する親和性を保持するビオチンの誘導体を測定するのに有用である。

【0090】本発明の他の実施態様によると、検体結合タンパク質は、レセプター、レクチン、輸送タンパク質などを含む（しかしながらこれらに限定されるわけではない。）結合タンパク質である。

【0091】

【実施例】以下、実施例によって本発明をさらに具体的に説明する。

【0092】実施例1：組み換え方法による酵素ドナーおよび酵素アクセプターの調製

以下のすべての実験において、すべてのDNA制限および修飾酵素は、ニューイングランドバイオラブス[New England Biolabs]（マサチューセッツ州ベベリー）から得られ、そして製造業者の指示に従って用いられた。

【0093】1. 酵素ドナー

1. 1. p125酵素ドナー

プラスミドp125を遺伝子操作し、温度誘発性プロモーター(λ Pr)の調節下に α -ドナー配列を置いた。さらに、発現した α -ドナーペプチドは、C-末端近くにシステイン残基を含むものである。これは、プラスミドpUC13をBglIで開裂することにより達成され、そして得られた一本鎖末端はS1ヌクレアーゼでの処理により除去された。プラスミドは次にBamHIで消化された。 β -ガラクトシダーゼ α -遺伝子をコード化する約170bpのDNAフラグメントが次にアガロースゲル電気泳動法によって精製された（図2参照）。

【0094】プラスミドp β gal2は、温度誘発性Prプロモーターの調節下に lacオペロンを有するプラスミドpCVQ2（クイーン、1983年、ジェイ.モレク.アプライド.ジュネテックス_2:1[Queen, 1983, J. Molec. Applied Genetics _2:1]）の誘導体である。その他の遺伝子構築のために有用な λ 調節配列を形成するために、プラスミドp β gal2は修飾された。プラスミドp β gal2はBamHIおよびSalIで消化され、そしてlacオペロンをコード化するDNA配列が除去された。pBR322配列（amp^rおよびoriを含む）およびC1Iを含むDNAフラグメントがアガロースゲル電気泳動により単離された。BamHI、EcoRI、HindIII、SalIおよびXbaIに関する認識配列を含む合成DNAリンカーが連結されそして次に、BamHIおよびSalI付着端を有するより短いマルチリンカーセグメントを作るた

めにBamHIおよびSalIで開裂された。これらのDNAフラグメントは、p β gal2から単離されたBamHI/SalIフラグメントに連結された。得られたプラスミドであるp121Bは、ベクターのBamHIとSalIの間にEcoRIおよびXbaI認識部位を含んでいる。プラスミドp121BはBamHIおよびPvuIで消化された。 β -ラクタマーゼ遺伝子（アンピシリン耐性amp^rを授与するものである。）、ファージλC1遺伝子（温度制御されたリプレッサー）および複製のプラスミド起10点(ori)を含むBamHI/PvuI DNAフラグメントがアガロースゲル電気泳動により精製された。pUC13からのBglI(-)/BamHI DNAフラグメントとp121BからのBamHI/PvuI DNAフラグメントが図2Bに示されるようにT4 DNAリガーゼを用いて連結された。この組換え型プラスミドは、一本鎖ファージM13およびその組換え体（ β -ガラクトシダーゼ変異体ポリペプチドM15をコード化するものである）の成長に関するエシェリキア・コリ細菌性宿主の1つであるJM83（メッシング、1979年、レコンビナントDNAテクニカルビュレッテン、NIHパブリケーションNo.79~99, 2, No.2:43~48[Messing, 1979, Recombinant DNA Technical Bulletin, NIH Publication No. 79-99, 2, No. 2:43-48]）中に形質転換され、そしてプラスミドp125が選択された。生体内相補が42°Cでは起こるが32°Cでは起こらず、プラスミドp125が温度誘発性 β -ガラクトシダーゼ α -タンパク質を産生することが示された。

【0095】1. 2. H, B, MおよびPシリーズ酵素ドナー

30 一連の実験において、検体カップリングドメインを含むタイプの酵素ドナーペプチドを得るために、（上記「酵素ドナー：改良されたカップリング化学特性」参照）種々の大きさの α -領域が、HaeI I、BglI I、MstIあるいはPvuIで消化されたpUC13（ビエイラとメッシング、1982年、ジーン_19:259~268；メッシング、1983年、メソッズインエンザイモロジイ_101:20-78；ベセスダリサーチラボラトリーズ、メリーランド州ガイゼルスバーグ[Vieira and Messing, 1982, Gene 19:259-268; Messing, 1983, Methods in Enzymology_101: 20-78; Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, MD]）から単離され、それぞれH-シリーズ、B-シリーズ、M-シリーズおよびP-シリーズをもたらした。B-シリーズ、P-シリーズおよびH-シリーズはT4 DNAポリメラーゼおよびS1ヌクレアーゼで処理された。M-シリーズは処理されなかった。それぞれのシリーズのDNAは、多重クローニング部位に位置するSacIで消化され、そして α -相補ペプチドをコード化する小さなDNA群は、製造業者によって述べられるように、アガロースゲル精製によって精製され、DEAE-セルロース紙（シュレイサー アンド シューレル[Schleicher and

Schuell]、ニューハンプシャー州ケーン) 上に電気泳動され、溶出されそしてエタノール沈殿された。

【0096】pBR322の2.3kb EcoR I - Pvu I I フラグメント中にクローニングされたエシェリキア・コリ trp プロモーター (EcoR I - Sst I、120bp) を有するプラスミド p141がNde Iで消化され、そしてDNAポリメラーゼクレノウ[Klenow] フラグメントならびに dATP および dTTP (ピーエル バイオケミカルズ[PL Biochemicals] ウィスコンシン州ミルウォーキー) で処理された。得られたDNAはSac Iで消化され、そして、M, B, H および P シリーズのDNAを受けるためのベクターとして用いられた。T4 DNAリガーゼでの処置に続き、DNAはエシェリキア・コリ株E9001 (Δlac pro, thi, SupE, F' pr oAB, lac I^o, Z M15, 株71.18とも呼ばれる; メッシングら, 1977年, プロク. ナトル. アカド. サイ. ユーエスエイ 75; 3642~3646 [Messing et al., 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75; 3642-3646]) 中に形質転換された。これらのDNA構築物は、マキサムとギルバート[Maxam and Gilbert] の方法(1980年, メソッズ インエンザイモロジイ 67: 499 [1980, Methods in Enzymology 67: 499])によって配列決定され、そして図4および5に示される。また、(*)で表わされるものは、検体の共有結合的付着のための部位である。

【0097】エシェリキア・コリ株E9001におけるTrp制御下に α -領域をコード化する得られた株は、Bシリーズに関しては、プラスミド p130を有する株MG130、Mシリーズに関してはプラスミド p129を有する株MG129、またHシリーズに関してはプラスミド p131を有する株MG131であった。

【0098】異なるクローニング α -領域の発現レベルを改良するために、 α -領域は新たなプラスミドへ移入され、そして λ Pr オペレーター-プロモーターの制御下におかれた。例えばMG141を作製するために、H-シリーズからのH6のDNA配列をコード化する遺伝子が、以下に述べるように λ Pr および λ C I 遺伝子のTrpプロモーターの置き換えによって、Pr 制御下に置かれた。

【0099】Trpオペレーター-プロモーター制御下にH6を含むプラスミド p131は、EcoR Iで消化され、そして大きな方の約2.1kbフラグメントがアガロースゲル電気泳動法によって単離された。 λ Pr および λ C I 遺伝子は、p125のEcoR I消化の小さなフラグメントからゲル精製された。p131の2.1kbフラグメントは、p125からの小さなフラグメントに連結され、事実上Trpプロモーターを λ Pr および λ C I プロモーター系と置き換えた。この処方が λ Pr 制御下の以下のプラスミドおよび菌株、すなわちBシリーズに関しては、プラスミド p139を有する株MG139; Mシリーズに関してはプラスミド p140を有する株MG

140; およびHシリーズに関してはプラスミド p141を有する株MG141を得るために、p130およびp129を用いて繰返された。DNA構造は、マキサムとギルバート、メソッズ イン エンザイモロジイ 67: 49 (1980) [Maxam and Gilbert, Methods in Enzymology 67: 499 (1980)] の方法によって配列決定され、そして図4および5に示される。

【0100】1.3. p148酵素ドナー

p125からの λ Pr 配列を利用して、新たなプラスミドが、ペプチドのN-末端側にシステイン残基を与るために、作製された。この新たなプラスミドである p148 はまた、ペプチドのC-末端近くに位置した3つのシステイン残基を含んでいるものであった。プラスミド p125がBamH I およびEcoR Iで消化され、約1000bpのフラグメントが、該ベクターより切り出され、そしてアガロースゲル電気泳動により精製された。このフラグメントは λ Pr 配列を含むものであり、これは、pUC12の唯一のBamH I / EcoR I 制限部位中に連結された(メッシング, 1983年, メソッズ イン エンザイモロジイ 101: 20~78 [Messing, 1983, Methods in Enzymology 101: 20-78])。この組換え型プラスミドはJM83細胞中に形質転換され、そして上記に述べた p125の作製と同一の様式において42°Cで生体的に相補することが見出された。酵素-ドナー p148の構造はまた図6に示され、これは検体の付着に関して本発明により利用されるものであるアミノおよびスルフヒドリル基カッピング部位の位置を含むものである。

【0101】1.4. 酵素-ドナー3

酵素-ドナー3 (ED3) は、H6から作製された酵素-ドナー1 (ED1) から作製された。ED1は以下のようにして作製された。

【0102】DNAフラグメントの合成は、アプライドバイオシステム、インコーポレーテッド(エイビーアイ、カリフォルニア州フォスター・シティ) モデル380A DNAシンセサイザー[Applied Biosystems, Inc. (ABI, Foster City, CA) Model380A DNA Synthesizer]において行なわれた。それぞれの配列は、プログラムメモリーに入力され、そして機械は、所望の一本鎖DNAを自動的に製造し、孔径制御ガラス支持体からそれぞれのフラグメントを開裂し、そしてバイアル(小瓶)中にDNAを集めた。DNA試料は、濃縮NH₄OH 1.5mlで6~24時間、55°Cで処理され、そしてサバントスピード ヴァク コンセントレーター[Savant Speed Vac Concentrator] 中で乾燥状態とされた。

【0103】それぞれのDNAフラグメントの乾燥ペレットは、ホルムアミドの微量(100~200 μ l)に溶解され、そして12%アクリルアミドゲル(BRL Model S0, 30~40cm, 厚さ1.6mm)上に精製され、そして200ボルトで一晩電気泳動された。所望のバンドが、螢光バックグラウンドとしてベーカー-フ

レックス シリカゲル IB-F (ジェイ ティー ベーカー ケミカルカンパニー) [Baker-flex silica gel 1B-F (J.T. BakerChemical Co.)] を用いて視識化された。所望のDNAバンドは、カミソリ刃を用いてゲルより切り出され、そして該DNAは、インターナショナルバイオテクノロジーズインコーポレーテッド (IB I) モデル UEA ユニット [International Biotechnologies Inc. (IBI) Model UEA unit] において製造業者の指示に従いポリアクリラミドゲル断片から電気泳動された。DNAは、微量の緩衝液中にを集められ、そしてエタノール沈殿された。該フラグメントは、製造業者の指示に従いT4 ポリヌクレオチド キナーゼで処理された。相補的DNA鎖が組合され、2分間90°Cに加熱され、そして室温に徐冷された。アニーリングされたDNAは、ハイブリッド (交雑) されていない鎖を除去するためにアガロースゲル電気泳動によって精製され、そして連結反応に用いられた。

【0104】出発プラスミドは、制限部位BamH I とSal Iとの間に挿入されたλ Pr 制御下のH6遺伝子を含むp169であった (図15参照)。H6からED1への変化は、H6のN-末端とC-末端の双方を、これらの間のα-ドメインを完全に残しつつ、変化させることを含むものであった。p169の2つの部分標本 (アリコット [aliquot]) が制限酵素を用いて切断された。第1の部分標本は、EcoR I およびBgl Iで消化され、そして小さな150bp [base pair] フラグメントがゲル精製された。p169の第2の部分標本は、BamH I およびSal Iで消化された。これは、プラスミドをベクターおよびα-ドナー遺伝子領域に開裂する。ベクター部分がゲル精製された。

【0105】ED1の新たなN-末端コーディング領域は、アプライドバイオシステム インコーポレーテッドの機械によって合成された75bp DNAフラグメントであった (図16参照)。新たなC-末端コーディング領域である50bp DNAフラグメントが、また合成された (図16参照)。この2つの新たなDNAフラグメントが、小さなEcoR I - Bal I H6 DNAフラグメントに連結された。この混合物は、約275bpの新たなED遺伝子を得るために、BamH I およびSal Iで切断された。このDNAの断片は、ゲル精製されそしてベクターBamH I - Sal I DNAフラグメント中に連結された。

【0106】ED1配列を確認した後に、このプラスミド (p181、図17を参照のこと) は、BamH I とEcoR Iで切断され、75bp ED1 N-末端が除去された。この領域は、BamH I - EcoR I スペース中に置換された30bpの新たな合成フラグメント (図16参照の

こと。) によって置き換えた。

【0107】これゆえED3は、ED1より15アミノ酸短いものであり、そのN-末端近くにシステイン残基を有する。ED1は、その配列中にシステインあるいはリシンのいずれも有しない。図18はED3のアミノ酸配列を画くものである。

【0108】1. 5. 酵素ドナー 3A

酵素ドナー3A (ED3A) のアミノ酸配列は図18に示される。該ペプチドは、ベックマン (カリフォルニア州パロアルト) 990B ペプチドシンセサイザー

【Beckman (Palo Alto, CA) 990B Peptide Synthesizer】において合成される。合成方法はステワートとヤング [Stewart and Young] (ソリッド フェーズペプチドシンセシス, 176pp, ペース ケミカル カンパニー, イリノイ州ロックフォード, 1984年 [Solid Phase Peptide Synthesis, 176bp, Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois, 1984]) によって述べられるようなものである。一般的な化学薬品は、アルドリッヂ [Aldrich] (ウィスコンシン州ミルウォーキー) からのものである。BOC-アミノ酸はペニンスULA ラボラトリーズ [Peninsula Laboratories] (カリフォルニア州ベルモント) からのものである。側鎖保護は、Boc-Thr (OBzl)、Boc-Clu (OBzl)、Boc-Ser (OBzl)、Boc-Asp (OBzl)、Cys (MeOBzl)、Boc-Asn/HOBt、Boc-Arg (TOS) およびBoc-His (TOS) である。バイオ-ラッド ラボラトリーズ [Bio Rad Laboratories] (カリフォルニア州リッチモンド) からのアミノメチルポリスチレン固相樹脂ビーズは、ステワートとヤング (1984年) によって述べられるようにジクロロヘキシルカルボジイミドを用いてp-ヒドロキシメチルフェニル酢酸Boc-Thr (OBzl) にエステル化される。用いられた合成スケールは、固相樹脂に付着したBoc-Thr 1ミリモルとそれぞのBoc-アミノ酸3ミリモルである。合成器は次に合成を実行するためにプログラムされる。得られたペプチドは、無水フッ化水素酸を用いて樹脂から開裂され、そして酢酸で抽出される。水素添加に続き、ペプチドは、0.1%TFAおよび0.1%エタンチオールを含む水中に0~80%のアセトニトリル濃度勾配でウォーターズ [Waters] フェニルカラムを用い調製用逆相HPLCによって精製される。部分的に精製されたペプチドは、1mM NH₄ HCO₃、1mM 2-メルカプトエタノール中に徹底的に透析され、そして凍結乾燥された。ペプチドのアミノ酸分析は表2に示される。

【0109】

【表2】

ED3Aのアミノ酸分析

アミノ酸	理論上	検知
ASP (アスパラギン酸)	5	4. 25
THR (トレオニン)	3	2. 13
SER (セリン)	3	2. 39
GLU (グルタミン酸)	5	5. 22
PRO (プロリン)	3	3. 33
GLY (グリシン)	1	0. 87
ALA (アラニン)	5	5. 65
CYS-PE (システイン-PE)	1	1. 10
VAL (バリン)	3	2. 27
MET (メチオニン)	0	0
ILE (イソロイシン)	1	0. 48
LEU (ロイシン)	4	3. 12
TYR (チロシン)	0	0
PHE (フェニルアラニン)	1	1. 16
HIS (ヒスチジン)	1	1. 11
TRP (トリプトファン)	2	1. 61
LYS (リジン)	0	0
ARG (アルギニン)	5	5. 00

分子量は、アミノ酸の平均分子量が114.943で
4942.53である。

【0110】要約すると、図4～6に示されるペプチドは、必要とされる α -相補する配列から、変化された距離に、都合のよいカッティング側鎖を与える。組換え法により作製されたペプチドをコード化するDNA配列は、標準的なマキサムとギルバートの技術によって決定され、予言された構造が確認された。H6のアミノ酸組成は、アミノ酸分析によって確認された。

【0111】1. 6. ED酵素ドナーシリーズ
EDシリーズと呼ばれる一連の酵素ドナーは、組換えDNA技術を用いて作製された。ED3は、すでに上記1.4において述べられている。このシリーズの他のメンバーには、ED4, ED5, ED7, ED8, ED13, ED15およびED17が含まれる。酵素ドナーのEDシリーズのアミノ酸配列は図19～23に表わされる。

【0112】ED4に関しコードする遺伝子は、以下の配列のDNAフラグメントをアプライドバイオシステムズ、インコーポレーテッドモデル380A DNAシンセサイザーにおいて（上記1.4において述べるように）最初に合成することによって作製された。

【0113】
【化7】

* 50
TGC CCT TCC CAA CAG TTG CGC AGC CTG AAT
TA ACG GGA AGG GTT GTC AAC GCG TCG GAC TTA
Pvu I

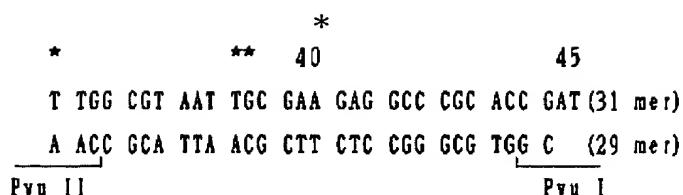
60
GGC CTC GAG TCT AGA TCT GCA GGC ATG (57 mer)
CCG GAG CTC AGA TCT AGA CGT CC (55 mer)
Sph I

【0114】星印でマークされた“T”は、“C”からの変更を表わす。このフラグメントは、プラスミドp181 (ED1) からのBamH I - Pvu I 切片に連結された（図17参照のこと。）。得られた切片は、除去されたBamH I - Sph I 領域を有するベクター (ED1-p181からのもの) 中に連結し返された。C (シトシン) のT (チミン) への変更は、システイン (cys) 残基を生成し、そして連結の後にPvu I 部位を破壊する。（粘着性の[sticky]端部は、連結に関しても同様に維持される。）

ED5に関してコードする遺伝子は、以下の配列のDNAフラグメントを最初に合成することによって作製され

た。

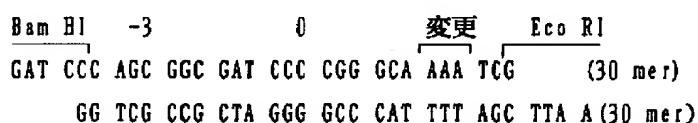
【0115】



【0116】1つの星印でマークされた“T”は、“C”からの変更を表わす。2つの星印でマークされた“T”は、“A”からの変更を表わす。CのTへの変更は、Pvu I部位を破壊する。A(アデニン)のTへの変更は、セリン残基をシスティン残基へ変更する。このフラグメントは、プラスミドp182(ED2ないしはM15)DNAからのBamH I - Pvu I I断片およびPvu I - Sal I断片に連結された(図17参照のこと)。連結された物質は、BamH IおよびSal Iで切断され、BamH I - Sal I領域が除去されたプラスミドp182中に挿入された。

【0117】ED7に関してコードする遺伝子は、Eco R IおよびSal Iの双方を用いてp183(ED3)およびp184(ED4)を切断することにより作製された。p183からのベクターはゲル精製(Eco R I - Sal I(α)領域を有効に除去する。)された。これに対して、p184からの小さなEco R I - Sal I(α)領域がゲル精製された。このp184Eco R I - Sal I領域が次に、p183Eco R I - Sal Iベクター中に挿入され、連結された。

【0118】ED8に関してコードする遺伝子は、M13mp11ファージDNAにおける部位特異的変異誘発を用いて作られた。プライマーが作製された(配列GGT AAC GCA AGG GRT TTC CCA G TC)。このプライマーは、アミノ酸15~22番に関しコードするα-領域のセンス鎖[sense strand]に相補性である。所望される変更は、M13mp11、DNAのα※



【0121】この合成フラグメントは、ED3を作製することに関して上記1.4において述べたと同様にしてp182(ED2)中に置換された。

【0122】ED14(p194、図24参照のこと)に関してコードする遺伝子は、以下の配列のDNAフラグメントを最初に合成する(上記と同様)ことにより作製された。

【0123】

【化10】

※-領域におけるアミノ酸20番でGlyをCysに変更するコドン20におけるGのTへの変更であった。これは、10プライマーを一本鎖M13mp11ファージDNAにハイブリット形成させ、そしてDNAポリメラーゼI“クレノウ[Klenow]フラグメント”およびT4DNAリガーゼを用いて室温にて一晩プライマーを延長させることによって達成された。このDNAは、非二本鎖DNAを消去するためにS1ヌクレアーゼで処理され、次にJM103細胞に形質転換された。この形質転換からのファージは単離され、DNAが精製され、そしてプライマー伸長および形質転換が合せて3回繰返された。それぞれの反復は、所望される産物に関して豊かなものとした。最後にミニ標本分析[mini-prep analysis]が、個々のプラーカからのM13RF DNAにおいて行なわれた。所望の塩基変更は、BstN I部位を消失した。BstN Iを用いてのミニ標本DNAの制限分析は、候補物を識別した。所望の変更を担う二本鎖M13RF DNAから、BamH I - Bgl I断片が切り出され、そしてED2に関してコードするプラスミドにおけるBamH I - Bgl I断片と交換された。

【0119】ED13(p193、図24参照のこと)に関してコードする遺伝子は、以下の配列のDNAフラグメントを最初に合成する(上記と同様)ことにより作製された。

【0120】

【化9】

Ly:

lys
 変更 50 55
 AAA CCT TCC CAA CAG TTG CGC AGC CTG AAT
 TA TTT GGA AGG GTT GTC AAC GCG TCG GAC TTA
 Pvu I
 60
 GGC CTC GAG TCT AGA TCT GCA GGC ATG (57 mer)
 CCG GAG CTC AGA TCT AGA CGT GC (55 mer)
 Sph I
 10
 lys
 Pvu II 変更 40 44 Pvu I
 T TGG CGT AAT AAA GAA GAG CCC CGC ACC GAT (31 mer)
 A ACC GCA TTA TTT CTT CTC CGG GCG TGG C (29 mer)

【0127】このフラグメントはED5を作製するため
に用いたものと同様の方法においてp182(ED2な
いしはM15)中へ挿入された。

【0128】ED17(p197、図24参照のこと)
に関してコードする遺伝子は、ED7に関しコードする
遺伝子が作製されたものと同様な方法において作製され※

*【0124】この合成フラグメントは、システイン置換
に代わりリシン残基という結果となる以外は、ED4に
関して用いられたものと同様の術策を用いて作製され
た。

【0125】ED15(p195、図24参照のこと。)
に関してコードする遺伝子は、以下の配列を有するDN
Aフラグメントを最初に合成する(上記と同様)ことによ
り作製された。

【0126】

【化11】

※たED13およびED14遺伝子の組合せである。

【0129】表3に示されるものは、酵素ドナーのED
20 シリーズと用いられ得る酵素アクセプターの列挙であ
る。

【0130】

【表3】

酵素ドナー	酵素アクセプター *
ED3	M15, EA1, EA14, EA20, EA22
ED4	M15, EA1, EA14, EA20, EA22
ED5	M15, EA1, EA14, EA20, EA22
ED7	M15, EA1, EA14, EA20, EA22
ED8	M15, EA1, EA14, EA20, EA22
ED13	M15, EA1, EA14, EA20, EA22
ED14	M15, EA1, EA14, EA20, EA22
ED15	M15, EA1, EA14, EA20, EA22
ED17	M15, EA1, EA14, EA20, EA22

* その他の酵素アクセプターは試験されていない。

【0131】上記の酵素ドナーと酵素アクセプターの対
のうち、ED5とEA22の組合せが、本発明の相補性
検定法における使用に最も好ましい対である。

【0132】2. 酵素アクセプター

実験の一群において、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子の枠
内配列欠失のシリーズが、上記実施例1、1. 酵素ドナー
において述べられた方法により酵素アクセプターのシ
リーズを調製するために構築された。pUC13が、P
vuI I (平滑末端[blunt end]を生じる)で消化され、
そしてXhoI制限部位を含む8bp合成DNAリンカーに
連結され、新たなプラスミドであるpUC13Xが生成
した。

【0133】XhoI制限部位を含む α -領域が次に、天

然 β -ガラクトシダーゼをコード化する完全 λ lacZ遺伝
子中に lacZ遺伝子の残余物[remainder]あるいはバッ
40 クグラウンドプラスミドを崩壊することなく置き換えら
れた。このZ遺伝子は2つのBglI部位を含むものであ
る。これらのBglI部位の最初のものは、XhoIリンカ
ーが挿入されたPvuI I部位より下流のpUC13中に
おける α -領域内に含まれる。これゆえ、pUC13X
からの α -領域は、BamH IとBglIでの消化によりプ
ラスミドの残余物から除去され、そしてこの170bpフ
ラグメントはB1Xと呼称された。

【0134】 β -ガラクトシダーゼをコード化する λ lac
Z遺伝子の残余物は、プラスミドp β gal 2(クイ
ン、1983年、ジェイ.モル.アブル.ジェネット.2:

1 [Queen, 1983, J. Mol. Appl. Genet. 2:1])から得られた。このプラスミドはBgl I およびEco R I で消化され、そしてZ遺伝子の93%を表わす2つのDNAフラグメントが単離された。それぞれのフラグメントの末端は、この作製において用いられるその他の末端のいずれとも異なるものであった。単離されたフラグメントは、2115 bp (以下B2と呼ぶ。) および737 bp (以下B3と呼ぶ。) であった。Z遺伝子におけるEco R I 制限部位は、遺伝子のC-末端近くにある。この末端はXba I 部位を含む遺伝子が作製される場合、存在すべきである。

【0135】変異体Z遺伝子がpF29中に挿入された。プラスミドpF29は、Eco R I 部位でZ遺伝子のC-末端に融合されたZ遺伝子 α -領域を含むものである。この α -領域は、Bam H I 部位に挿入された λ Prプロモーターによって制御される。pF29を作製するために、2つの中間プラスミド、pF15およびpF16が作製された。p β gal 2がAva I で消化され、付着3'末端[cohesive 3' end]がクレノウフラグメント[K lenow fragment]および4つのdNTPを用いて満たされ、平滑末端が生成された。Sal I リンカー(GGTC GACC) (ニューイングランドバイオラブス[New England BioLabs]、マサチューセッツ州ベバレイ)が、T4 DNAリガーゼを用いて線状化プラスミドに連結された。得られたDNAはEco R I およびSal I で消化され、 β -ガラクトシダーゼZ遺伝子のオメガ(ω)末端を表わす300 bp DNAフラグメントがアガロースゲル電気泳動によって精製された。この ω -領域は以下のようにしてPrの制御下の α -領域に融合された。pUC12 DNA (ベセスタリサーチラボラトリーズ[Bethesda Research Laboratories]、メリーランド州ガイゼルスバーグ)がBgl I で消化され、そしてクレノウフラグメントおよび4つのdNTPで処理することによって平滑末端が生成された。Eco R I リンカー(GGAA TTCC) (ニューイングランドバイオラブス、マサチューセッツ州ベバレイ)がT4 DNAリガーゼを用いて平滑末端に連結された。このDNAはBam H I およびEco R I で消化され、Z-遺伝子の α -領域を表わす180 bp フラグメントがアガロースゲル電気泳動によって精製された。遺伝子フラグメントおよび ω -遺伝子フラグメントを受け入れるために用いられたベクターは、Bam H I およびSal I で消化されそしてlacオペロン配列を除去するためにアガロースゲル電気泳動により精製されたp β gal 2であった。該ベクター、 α -遺伝子フラグメントおよび ω -遺伝子フラグメントは、T4 DNAリガーゼを用いて連結し合された。該DNAフラグメントの非反復の末端は、これらのフラグメントがクローニングされた順序を指図するものである。生成プラスミドはpF15と呼称された。

【0136】pF15は、pF15をPvu I I で消化す

ることによって生成した平滑末端に連結したSal I リンカーを用いて、非反復のPvu I I 部位をベクターSal I 部位に転化することによってさらに修飾された。この修飾pF15は、次にBam H I およびSal I で消化され、そして最も長いDNAフラグメントがアガロースゲル電気泳動によって精製されて、 α - ω 遺伝子配列およびSal I 部位とPvu I I 部位の間に位置するDNAフラグメントが除去された。修飾されていないpF15がまた、Bam H I およびSal I で消化され α - ω フラグメントが精製された。修飾pF15からの大きなフラグメントがこの α - ω フラグメントに連結され、プラスミドpF16が生成された。

【0137】pF16は、pF15より約1350塩基対だけ小さいものであり、非反復なNde I 部位をSal I 部位に極めてより近いものに移動する効果を有する。この巧妙な処置は、その後の作製を通じて担われるものから不必要なDNAを消去する。

【0138】pF29を作製するために、pF16はCla I およびNde I で消化され、そして λ C I、 λ Pr な

らびに β -ガラクトシダーゼの α -および ω -領域をコード化する1400 bp DNAフラグメントがアガロースゲル電気泳動法によって精製された。pUC13をAcc I およびNde I で消化し、ベクターをアガロースゲル電気誘導法によって精製した。Acc I およびCla I 制限部位が同一の付着末端を有し、またNde I 制限部位が同一の末端を共有するゆえに、pF16からのDNA挿入物とpUC13ベクターとの連結は、1回の配向のみで生起する。T4 DNAリガーゼを用いての連結はpF29を生成する。pF29は、1つのEco R I 部位を含み、またCla I 部位を含んでおらず、このことは、第2のEco R I およびCla I 部位は、修飾プラスミドの作製を阻害するであろう(例えば、以下に述べるp149、およびp150から生成される欠失変異体のその後の分析)ゆえに望ましいものであった。

【0139】pF29はBam H I およびEco R I で消化され、間にある α -ドナーが除去され、そしてこのベクターはB1XにB2を加え、さらにB3を加えたもの

(B1X+B2+B3)を用いて満たされた。それぞれの断片の非反復一本鎖末端は、該断片が連結し合いで40ある順序を定義する。B1X、B2およびB3は、上記に述べたようにBam H I およびEco R I で消化されたpF29ベクター中に連結され、これにより、 λ Pr制御下に、アミノ酸34をコード化する塩基対102で、Xba I リンカーを用いてZ遺伝子が再構築される。得られたプラスミドはp149と呼称された。

【0140】Xba I およびBal 3 1での消化に続く、生存可能な酵素アクセプターの生成についてスクリーニングするための方法を開発するために、Xba I を有しない別個の α -ドナーがp149中へ挿入された。lac Zオペレーター、プロモーターおよび α -ドナーを含むpU

C 13 からの FnuD I I 消化フラグメントが、クレノウフラグメントを用いて満たされた p149 の Sal I 部位中に挿入された。得られたプラスミドは p150 と呼称された。欠失が、p150 を Xho I で消化し、そして次に該DNAを Bal 3 1 エキソヌクレアーゼで消化することによって作製された。Bal 3 1 処理の後、プラスミドは T 4 DNA リガーゼで連結され、そして AMA 1004 宿主細胞 (AMA 1004 は、galU、galK、strA^r、hsdR^r、leuB 6、trpC 9830、△ (lacI P O Z) である。) C 29 (カサバダンら、1983 年、メソシズ イン エンザイモロジイ 100: 293 [Casanbadan et al., 1983, Methods in Enzymology, 100: 293]) 中に形質転換され、そして誘導物質イソプロピル-チオガラクトシド (IPTG) および色素産生性基質5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド (Xgal、シグマケミカル カンパニー、ミズーリー州セントルイス) を含むルリア-ベルタニ [luria-Bertani] プレート上でスクリーニングされた。30℃では白色だが 42℃では青色のコロニーは、生存可能な酵素-アクセプターの生成を示した。コロニーが選択され、プラスミドDNAが調製された。プラスミドDNAは、α-ドナーを除去するために Sal I で消化され、再連結された後、AMA 1004 宿主細胞に形質転換された。配列欠失は、マキサムとギルバート [Maxam and Gilbert] の配列決定法により確認され、そして酵素アクセプターは、以下の実施例 2、1. において述べるようにして精製された。得られた株は、図 7 および 8 に示される。

【0141】酵素アクセプターは、DNA合成技術を用いて作製された。例えば酵素-アクセプター 1 (ED 1) は、Xho I リンカーを含む α-領域が表 4 に示される合成DNAフラグメント (5' → 3') と代えられることを除いては、p149 から作製された。

【0142】

【表4】

(1) CAA CAG TTG CGC AGC CTG AA
 (2) AGG CTG CGC AAC TGT TGG GAA GGG CGA TCG
 (3) ACC CAA CTT AAT ACC GAT CGC CCT TCC
 (4) GTA TAA AGT TGG GTA ACG CCA GGG CCT TCC CA
 (5) CAA CGT CGT GAC TGG GAA GGC CCT GGC GTT
 (6) GTC ACG ACG TTG TAA AAC GAC GGC CAG TGA ATT
 CGA GCT CGC CCC GG
 (7) GAT CCC CGG GCG AGC TCG AAT TCA CTG GGC GTC
 GTT TTA

【0143】これらのフラグメントは、lacZ 遺伝子のアミノ酸 26 ~ 43 番の枠内欠失をコード化するものであり、また BamH I および Bgl I の粘着性末端を担うものである。これらのフラグメントはアニーリングされ、ゲル電気泳動により精製され、BamH I で処理され、そして B 2 に B 3 を加えたもの (B 2 + B 3) にそして pF 29 ベクター連結された。陽性のコロニーが選択され、そしてDNA配列分析により確認された。

【0144】2. 1. 相補効率の比較

10 上記のようにして調製された酵素アクセプターの相補効率を評価するために、代表的酵素アクセプター調製物が H 6 を酵素-ドナーとして用いて比較された。

【0145】微小力価プレート形態が用いられ、これは $2.5 \times 10^{-8} M$ の適当な酵素アクセプター調製物および 1.25 mg/ml o-ニトロフェノール-β-D-ガラクトピラノシド基質を含む全容量 $200 \mu l$ の PM 2 緩衝液 ($0.5 M$ Na_2HPO_4 , pH 7.0, 1 mM MgSO_4 , 0.18 mM MnSO_4 , 1 mM EDTA, 0.02% NaN_3 , 0.05% トウイーン 20 [Tween 20]) から構成された。H 6 の一連の希釈物 (1:20, 1:40, 1:80) が相補を開始するために添加された。光学濃度 (414 nm) が、37℃での 30 分間および 40 分間インキュベーションで測定された。結果は表 5 に示される。

【0146】

【表5】

A. 37°Cでの30分間インキュベーション後のOD₄₁₄

H6希釈	EA23	EA14	EA22	EA24	EA20
1/20	0.118	0.736	0.708	0.273	0.526
1/40	0.062	0.351	0.361	0.142	0.277
1/80	0.030	0.171	0.174	0.071	0.128

B. 37°Cでの45分間インキュベーション後のOD₄₁₄

H6希釈	EA23	EA14	EA22	EA24	EA20
1/20	0.299	1.585	1.402	0.579	1.148
1/40	0.154	0.766	0.715	0.299	0.610
1/80	0.068	0.365	0.345	0.147	0.294

【0147】表5に示されるように、種々の酵素- アクセプターの相補効率は、相当異なるものであった。相対相補効率は、EA14=EA22>EA20>EA24>EA23であった。

【0148】実施例2：チロキシンに関する酵素免疫検定法

この実施例はチロキシンに特異的な抗体を検体結合タンパク質として用いる、チロキシンに関する免疫検定法を述べるものである。用いられた酵素ドナー-抗原は、ED4であり、また酵素- アクセプターはEA22である。

【0149】1. 酵素アクセプターの調製

β -ガラクトシダーゼの欠失変異体ポリペプチドが、所望の酵素アクセプター菌株をTYプロス（1リットル当たりバクトトリプトン[Bacto tryptone] 10g、酵母抽出物5g、NaCl 15gおよびグルコース1gを含む、pH 7.5）中で増殖させることにより調製された。細胞は42°Cで増殖させられた。細胞は遠心分離によって収穫され、破壊性緩衝液（BB）（0.2M Tris（登録商標）[Tris（登録商標）]-HCl pH 7.6、0.2M NaCl、0.01M酢酸マグネシウム、0.01M 2-メルカプトエタノール 5%グリセロール）で洗浄され、次に遠心分離によりペレット化され、そして凍結された。

【0150】細胞ペレット（15g）は40mlのBB中に懸濁された。リゾチーム[Lysozyme]（シグマケミカル、ミズーリー州セントルイス）が0.20mg/mlの最終濃度へ添加され、懸濁液は、-70°Cのアルコール浴中で凍結され、そして37°Cの水浴中で迅速に解凍され

た。解凍される懸濁液の温度を4°C以下に保つために注意がはらわれた。溶解物の粘度は、ビルソニック セルディスラプター[Virsonic cell disruptor]（モデル16-850、ビルティスカンパニー、ニューヨーク州ガーディナー[Model 16-850, VirtisCo., Gardiner, NY]）を用いての音波処理によって低減された。フェニルメチルスルフォニルフルオライド（PMSF、シグマケミカル）が0.1mMの最終濃度へ添加され、そして不溶性物質が遠心分離（16,000×g, 30分間）によって除去された。1/10容量の30%硫酸ストレプトマイシン溶液がゆっくりと上澄液に添加された。氷上で15分間の後、沈殿した核酸が16,000×gで20分間遠心分離することにより除去された。清澄化された溶解物は、ゆっくりと80%飽和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液の等容量を添加することにより、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ で40%飽和とされた。4°Cで2時間の搅拌に続き、沈殿した物質が、16,000×gで30分間遠心分離することにより集められた。

【0151】ペレットはBB中に再溶解されそして、氷中に0.1M NaH₂PO₄、pH 7.2、50mM NaCl、1mM MgSO₄、10mM 2-メルカプトエタノールを含有するものの1000容量に対して、6時間後に1回交換を行なって、透析された。透析された酵素- アクセプター抽出物は、同様の緩衝液中のアガロースに共有結合的に付着したp-アミノフェニル-1-チオ- β -D-ガラクトピラノシドの2.5×6cmカラムに適用された。カラムは、最初に0.1M NaPO₄、pH 7.2、50mM NaCl、10mM 2-メルカプトエタノールで、次に0.1M NaPO₄、p

H 7. 2, 50 mM NaCl, 10 mM 2-メルカプトエタノールで、最後に、0. 1 M NaPO₄、pH 7. 2, 50 mM ホウ酸ナトリウム pH 9. 0, 10 mM 2-メルカプトエタノール（当容量の2. 5 M トリス-HCl pH 7. 0 中）を用いて洗浄された。すべてのカラム操作は4°Cで行なわれた。

【0152】溶出した酵素アセプターは直ちに、0. 1 M NaH₂PO₄ pH 7. 2, 70 mM NaCl, 1 mM MgSO₄ (MgSO₄) および10 mM 2-メルカプトエタノールに対して十分に透析された。透析の後、グリセロールが10%まで添加され、そして抽出物は-20°Cで保存された。これらの調製物は、ラエムリの不連続ポリアクリルアミドゲル系[Laemmli discontinuous polyacryl-amide gel system]（ラエムリ、1980年、ネイチャー 227: 690[Laemmli, 1970, Nature 227: 690]）においてシングルバンドを生じた。

【0153】2. 酵素ドナーの調製

前記に述べた種々の酵素ドナーポリペプチドは宿主細胞から直接精製されることが不可能であった。例えば、エシェリキア・コリ株AMA 1004に見出されるこれらのペプチドのレベルはささいなものであった。これに対して、相補するペプチドに関しコードするプラスミドが、菌株E 9001 (Δ lac-pro, thi, supE, F' proAB, lacI^Q, ZM15, また71. 18とも呼ばれる；ミッシングら、1977年、プロ. ナトル. アカド. サイ. ユーエスエイ 75: 3642~3646[Messing et al., 1977, Pro. Natl. Acad. Sci. USA 75: 3642-3646]) に形質転換された場合、活性な β -ガラクトシダーゼが生体内相補により形成された。 β -ガラクトシダーゼが精製され、そして該相補するペプチドが、6 M 尿素を用いての該酵素複合体の変性により回収された。

【0154】細胞は0. 1%グルコース、50 μ g/ml アンピシリンおよび0. 3 mM IPTG を追補されたルリア ベルタニ[Luria Bertani] 培地において42°Cで16時間培養された。細胞は遠心分離により収穫された。以下の段階は、特に記述のない限り4°Cにて行なわれた。

【0155】12リットルの全培養容量からの約40 gの細胞が、80 mlの緩衝液A (50 ml トリス (登録商標), pH 7. 5, 50 ml NaCl, 10 ml MgCl₂, 10 mM 2-メルカプトエタノール) に再懸濁された。リゾチーム (シグマケミカル、ミズーリー州セントルイス) が0. 20 mg/mlの最終濃度へ添加され、そして該懸濁液は、-70°Cのアルコール浴中で凍結され37°Cの水浴中で迅速に解凍された。解凍される懸濁液の温度を4°C以下に保つように注意がはらわれた。溶解物の濃度は、ビルソニック セル ディプラスター (Model 16-850) を用いての音波処理によって低減された。フェニルメチルスルフォニルフルオライド (PMSF, シグマケミカル) が0. 1 mMの最終濃度へ添

加され、そして不溶性物質が16, 000 \times gで30分間遠心分離することにより除去された。1/10容量の30%硫酸ストレプトマイシン溶液がゆっくりと上澄液に添加された。氷上で15分間の後、沈殿した核酸が16, 000 \times gで20分間遠心分離することにより除去された。清澄化された溶解物は、ゆっくりと80%飽和 (NH₄)₂SO₄ 溶液の等容量を添加することにより、(NH₄)₂SO₄で40%飽和とされた。4°Cで2時間の攪拌に続き、沈殿した物質が16, 000 \times gで30分間遠心分離することにより集められた。ペレットは最小容量の緩衝液B (40 mM トリス (登録商標), pH 7. 5, 0. 1 M NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM 2-メルカプトエタノール) 中に溶解され、そして同じ緩衝液の200容量に対して透析された。

【0156】透析された溶液は、緩衝液Bで平衡化されたDEAE-セルロース (ワットマン DE-52 [Whatman DE-52]) の30 mlを充填した2. 5 \times 20 cmカラムにかけられた。カラムは、吸着されていない物質を除去するために150 mlの緩衝液Bで洗浄された。酵素は、NaClの直線濃度勾配 (40 mM トリス (登録商標), pH 7. 5, 10 mM MgCl₂, 10 mM 2-メルカプトエタノール中の0. 01~0. 50 M NaCl) で溶出された。それぞれの緩衝液成分の容量は75 mlであり、流速は0. 50 ml/分であった。分画が前に述べられたような酵素活性に関して検定された。ピーク活性は、約0. 3 M NaClで表われた。酵素活性を含む分画はプールされ、そして該プールは (NH₄)₂SO₄で40%飽和とされた。2時間の攪拌の後に、沈殿した物質が12, 000 \times gで30分間遠心分離することで集められた。ペレットは、最小容量の緩衝液Bに溶解され、そして次にバイオ-ゲル A-1. 5 m [Bio-Gel A-1.5m]を充填された1. 0 \times 120 cmカラム (床容量86 ml, バイオ-ラッド ラボラトリーズ [Bio-Rad Laboratories], カリフォルニア州リッチモンド) にかけられた。カラムは0. 10 ml/分の速度で緩衝液Bを用いて展開された。分画は酵素活性に関して検定され、ピーク活性を含む分画がプールされた。等容量の100%飽和 (NH₄)₂SO₄溶液がゆっくりと添加された。氷上で2時間の後、沈殿した物質が、12, 000 \times gで30分間遠心分離することにより集められた。

【0157】ペレットは最小容量の50 mM KH₂PO₄、pH 7. 3、1 mM EDTA 中に溶解された。溶液1 ml当たり0. 496 gの固相電気泳動純度の尿素 (バイオ-ラッド [Bio-Rad], カリフォルニア州リッチモンド) がゆっくりと添加され、プールの最終尿素濃度が6. 0 Mにされた。プールは、基質の添加後5分間の間何らの酵素活性も視認されなくなるまで、氷上に保たれた。変性された酵素プールは次に、セファデックスG-

75 [Sephadex G-75] を充填された $1.0 \times 120\text{cm}$ カラム (床容量 84ml , フラマシア フайн ケミカルズ [Pharmacia Fine Chemicals], ニュージャージー州ピスカタウェイ) にかけられた。カラムは、 6.0M 尿素、 5.0mM トリス (登録商標)、pH 7.6, 0.15MNaCl 、 1mM EDTA を用いて $0.10\text{ml}/\text{分}$ の流速で展開させられた。分画は、M15との相補活性に関して検定された。相補活性を含む分画がプールされた。この分画プールは 1mM NH_4HCO_3 4 リットルに対して 3 回透析され、そして凍結乾燥された。

【0158】3. チロキシン免疫検定法

α -マレイミド-ベンゾイル-L-チロキシン-H6 の酵素-ドナー結合体は以下のようにして調製された。

【0159】L-チロキシン (遊離酸) (6.80mg) が、無水メチルアルコール (6.0ml) を用いて転化され、そして該溶液が乾燥塩化水素の活発な蒸気を用いて飽和された。冷却の後、飽和手順が繰返され、そして溶媒が減圧下に除去された。得られた結晶性の沈殿物は濾去され、無水エチルアルコールを用いて洗浄され、次にジエチルエーテルで洗浄され、そして最後に乾燥された。乾燥されたチロキシンメチルエステルハイドクロライドは、 5.0% 水性エチルアルコール中に溶解されそして溶液は 2N 水酸化ナトリウム (1 当量) で処理された。おびただしい量の白色沈殿が直ちに形成されそして付加的な水が、沈殿を完全にするために添加された。沈殿した L-チロキシン メチルエステル遊離塩基を 1 時間冷却下に静置した後、該生成物が遠心分離により回収されそして真空下に乾燥された。L-チロキシンメチルエステル遊離塩基 (1.0mg) と α -マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミド エステル (MBSE) 5mg (ピース ケミカル カンパニー [Pierce Chemical Co.], イリノイ州ロックフォード) が、無水テトラヒドロフラン 1.0ml に溶解され、続いて粉末無水炭酸ナトリウム 1.0mg が添加された。混合物は 30 分間還流された。蛍光指示薬および溶媒系としての酢酸エチルを含む $\text{Si}\alpha 250\text{F}$ TLC プレート $5.0 \times 20\text{cm}$ (ベーカー [Baker], ニュージャージー州フィリップスバーグ) を用いる、シリカゲル G を利用する薄層クロマトグラフィー (TLC) による反応混合物の調査は、反応が約 70% 完了したものであることを示した。L-チロキシン メチルエステル遊離塩基と MBSE との生成物である、 α -マレイミド-ベンゾイル-L-チロキシン (MBTM) はクロロホルム:メタノール混合物を溶離溶剤として用いてシリカゲルカラムにより精製された。単離された MBTM の薄黄色の粉末は、TLC により検定された場合約 80% 純度であり、そして、MBSE あるいは L-チロキシンメチルエステルのいずれとも完全に異なる R_f を有していた。MBTM によって、蛍光指示薬を含むシリカゲル G における短波長紫外線での照射においてチロキシン

に関する特有の螢色を呈し、またニンヒドリン陰性およびマレイミド基の存在は、 $5,5'$ -ジチオビス-(2-ニトロ安息香酸) を用いてシステインと反応するその能力によって確認された。

【0160】H6 酵素-ドナー ポリペプチド ($10\mu\text{g}$) が、 0.1M リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.0 の 0.15ml 中に溶解された。攪拌された上記の溶液に対し、テトラヒドロフラン 1.0ml 中の α -マレイミドベンゾイル-L-チロキシン メチルエステル 0.3mg の

10 $5\mu\text{l}$ アリコートの 2 つが添加された。室温で 1 時間攪拌した後、反応混合物はバイオ-ゲル P-2 カラム [Bio-Gel P2 column] (バイオ-ラッド、カリフォルニア州リッチモンド) $0.6 \times 16.0\text{cm}$ 上で精製され、 0.1M ホウ酸ナトリウム緩衝液、pH 9.0 を用いて溶出された。10 滴分画が集められた。それぞれの分画のアリコートが、EA23 二量体および α -ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシドの存在における相補活性に関して検定された。分画 10 および 11 が最も高い相補活性を含んでおり、そしてこれらがプールされた。

20 【0161】本実施例は、酵素ドナーとしての H6-チロキシン結合体、酵素アクセプターとしての EA23、抗チロキシン抗体、および一連の濃度のチロキシンを用いる、検体としてのチロキシンに対する免疫検定を例示するものである。

【0162】該検定のための試薬は、以下のように調製された。

L-チロキシン標準: 2.6mg L-チロキシン (シグマケミカル、ミズーリー州セントルイス) が無水エタノール $2.00\mu\text{l}$ に溶解された。次に 0.15M NaHCO_3 $8.00\mu\text{l}$ が添加されそして混合物は 25°C で保存された。チロキシンの 2 倍希釈が、エタノール: 0.15M NaHCO_3 (1:4) で調製された。

30 【0163】L-チロキシン抗体: チロキシン (T4) に対する抗血清がウェスタン ケミカル リサーチ コーポレーション [Western Chemical Research Corp.]、コロラド州デンバーから購入された。いくつかのロットが力価に関して試験され、そして平衡定数が 1g M Sorb (エンザイムセンター [Enzyme Center]、マサチューセッツ州マルデン) を用いてのラジオイムノアッセイにおいて決定された。ロット群は、 $1:100$ から $1:8000$ の力価で変化した。平衡定数は $4.5 \times 10^8\text{L}/\text{M}$ から $1 \times 10^{10}\text{L}/\text{M}$ で変化した。力価 $1:8000$ (ゼロ結合 = 67%) で、 $K_{eq} = 2 \times 10^{10}\text{L}/\text{M}$ であるロットナンバー A420 が用いられた。

40 【0164】EA23 アクセプター酵素: 保存緩衝液中の $6.3 \times 10^{-7}\text{M}$ 。

【0165】基質: α -ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド (ONPG) は $2.5 \times 10^{-7}\text{M}$ 緩衝液に溶解され最終濃度 $1.0\text{mg}/\text{ml}$ 溶液とされた。

50 【0166】検定は、微小力価プレート (ダイナテック

カタログナンバー001-012-9200 アメリカン サイエンティフィック プロダクツ、カリフォルニア州サニーヴェール[Dynatech Cat# 001-012-9200 American Scientific Products, Sunnyvale CA)中で行なわれ、そして414nmフィルターを備えたティータックマルチスキャン微小力価プレート リーダー[Titertek Multiscan microtiterplate reader](フロウ ラボラトリーズ、メリーランド州ロックビル[Flow Laboratories, Rockville, MD])において読み取られた。それぞれのウエル(窓[well])に対し0.05%トウイーン 20*10

*[Tween 20] (ポリオキシエチレン ソルビタン モノラウレート) (シグマケミカルカンパニー、ミズーリー州リセントルイス) を含むPM2緩衝液が添加された。それぞれのウェルに対して、連続的に、H6-チロキシン結合体2.5μl、抗チロキシン抗体2.5μl、チロキシン標準物質2.5μlおよびEA2340μlが添加された。結果は表6に示される。

【0167】

【表6】

チロキシンに対する酵素免疫検定

ウェル	H6-T4 ^a		抗体	チロキシン (μg/μl)	EA23 ^b	
	(μl)	(μl)			(μl)	OD ₄₁₅
1	-	-	-	-	40	0.002
2	2.5	-	-	-	-	0.001
3	2.5	-	-	-	40	0.595
4	2.5	2.5	-	-	40	0.300
5	2.5	2.5	6.25	-	40	0.312
6	2.5	2.5	12.5	-	40	0.320
7	2.5	2.5	25	-	40	0.364

(a) H6-T4はm-マレイミド-ベンゾイル-L-チロキシン-H6結合体をさす。

(b) EA23は酵素-アクセプターポリペプチドをさす(図7参照)。

【0168】実施例3：B型肝炎ウィルス表面抗原検定
この実施例は、酵素ドナーとしてN-末端あるいはC-末端融合タンパク質を用いての、B型肝炎ウィルス表面抗原(HBV-S Ag)を測定するための免疫検定法を示すものである。

【0169】1. N-末端融合体

非反復のEcoRI部位において挿入されたHBVの完全ゲノムを含むプラスミドpBR322がHincI Iで開裂された。フラグメントB(スニンスキーら[Sninskey et al.]、上記)は、pUC13の非反復のHincI I部位中にクローニングされた(メッシング[Messing] 1983年、上記)。このクローンから、HBV-S Ag遺伝

子のほとんどを含むBamHI-AhaI I Iフラグメントが、BamHIおよびSmaIで消化されたpUC13中に挿入された。この組換えDNAプラスミドp122がエシェリキア・コリのJM83株中へ形質転換され、そしてHBV-S Ag酵素-ドナーによる生体内相補を示す、Xgalプレート上のライトブルーのコロニーが選択された。このクローンMG122は、アボット アウスマザイム I I (1) 試験[Abbott Auszyme II (1) test](アボット ラボラトリーズ、[Abbott Laboratories], イリノイ州シカゴ)における交差反応によってHBV-S Agを含むことが明らかにされた。このHBV-S Ag α-ドナー融合体は、大量の融合体を生成するために

他の発現ベクター中へ移入されることができる。

【0170】2. C-末端融合体

例えば、B型肝炎表面抗原 (HBV-S Ag) は、酵素ドナーポリペプチドのカルボキシ末端でクローニングされ得る。用いられ得る一つの処方は、例示的実施例として以下に簡単に概要される。

【0171】 1. 2 kb FnuD I I フラグメントが、完全HBVゲノムのクローニングから単離されそして pBR322中に挿入された。S1ヌクレアーゼおよび子ウシ腸ホスファターゼで処理された、p125のPvu I部分消化物が次に、完全な長さの線状分子を得るためにアガロースゲル精製された。p125の線状DNAへのFnuD I I フラグメントの連結に続き、このDNAはエシェリキア・コリ（例えばJM83）中へ形質転換される。Xgalプレートにおいて30°Cで白色でかつ42°Cで青色のアンピリシン耐性のコロニーが次に選択され、HBV-S Agにおける産生に関してスクリーニングされた（例えば、アボット アウスザイム II 試験）。融合タンパク質は、次に相補性に関し検定する標準的イオン交換およびアフィニティカラム技術によって精製された。

【0172】3. HBV-S Ag に関する酵素免疫検定
試料中のHBV-S Agの存在あるいは量を測定するための免疫検定法が、関心の試料中の未知のHBV-S Agを α -HBV-S Ag融合タンパク質と、相同性を有する抗原に関して競合させることにより作製された。活性な β -ガラクトシダーゼを生成するようにEA23を相補するのに有効な遊離 α -HBV-S Agタンパク質の量は、計測される未知の遊離HBV-S Agの量に逆比例するであろう。

【0173】実施例4：肝炎B型ウィルス ヨア抗原検定法（アッセイ）

肝炎B型ウィルス (HBV) ゲノムDNAを制限酵素BamH I およびEcoR I で切断して2個の大きなDNAフラグメントを产生した。これらの大きなフラグメントの1つは、コア抗原をコード化するコア遺伝子を有する (HBV-C Ag)。このフラグメントをM13 mp 10 RF DNAの多クローニング部位に挿入した。このHBV挿入物を有するM13ファージの選択およびスクリーニング後、小量のファージを精製した。コア遺伝子の(-)極性鎖 (メッセンジャーRNAの反対極性) を有する一重鎖DNAをファージから単離した。

【0174】大部分の遺伝子のように、コア遺伝子はA

TGコドン（遺伝暗号）から始まる。コア遺伝子がクローニングされた発現ベクターは、すでにATGコドンを与えられているので第2コアコドンから始まるDNAフラグメントを得ることが必要であった。このことは、コア遺伝子のコドン2-5の(+)鎖(メッセンジャーRNAと同一極性)を示す12塩基対の一本鎖オリゴマーを合成することにより達成された(GAGATTGAC

C C T)。このオリゴマーは一本鎖M 1 3 ファージDN Aに対してハイブリッド形成され、エシェリキア・コリ(E. Coli)DNAポリメラーゼI(クレノウ フラグメント)により試験管内で [in vitro] 伸長された。この調製物を、コア遺伝子の外部のHBV DNAを翻訳終結コドンの3'側で切断する Hinc II で消化した。その後に、ヌクレアーゼS 1は、一本鎖DNAをコア遺伝子の第2コドンの5'側を消化するために使用された。これは、6 8 6 塩基対フラグメントおよび多数の小さな

10 種々の長さの二重鎖フラグメントを残す。686の塩基対フラグメントをアガロースゲル電気泳動法により精製した。使用されたプラスミド発現ベクターは、Prプロモーターおよび制限酵素BamH I の次にATG出発コドンを有した。ベクターをBamH I で消化し、ヌクレアーゼS 1 で処理し、平滑端末を有する（プラント エンド化）ベクターとした。

【0175】プラント エンド化発現ベクターおよびコア遺伝子フラグメントをT4 DNAリガーゼを使用して連結し、そして受容能力のあるバクテリアに形質転換した。得られたコロニーをスクリーニングし、プラスミドを同定し、通常の配向性でコア遺伝子を挿入した。ザ

した。得られたコロニーをスクリーニングし、プラスミドを同定し、通常の配向性でコア遺伝子を挿入した。ザアボットコアアンチゲンイーエルアエスエイテスト(the Abbot Core Antigen ELISA test)(アボットラボラトリーズ)により、コロニーは細胞溶解産物中の抗原タンパク質の存在に関し試験された。プラスミドp152を含有するMG152として呼称される強力な免疫反応陽性クローニングが選択され、DNA配列はマキサム-ギルバート(Maxam-Gilbert)DNA配列法により確認された。コア抗原は精製され、抗体を再產生するため30に使用された。

【O 1 7 6】pF 2 9の α 領域のアミノ末端における制限部位のいずれもが α 領域とコア遺伝子との融合に適さないために、 α 遺伝子のアミノ末端において多クローニング領域中の異なる制限部位を有する第2プラスミドを構築することが必要であった。pUC 1 3をEcoR Iで消化し、粘着性末端をDNAポリメラーゼ ラージフラグメント（クレノウフラグメント）に全ての4つのdNTPsを加えたもので満たした。Pvu I I 8 bp (G C A G C T G C) リンカーDNAはこの部位に結合した。この修飾プラスミドを、BamH IとPvu I Iで消化し、多クローニング部位にPvu I I リンカーを加えた α -断片のN-末端を単離した。pF 2 9プラスミドDNAを同様にBamH IとPvu Iで消化し、pF 2 9 α -領域を除去し、 α 領域のN-末端の多クローニング領域中に新規配列を含む α -領域と置換した。この新しいプラスミドは、p154と呼称された。

【0177】コア- α 融合タンパク質を構築するため
に、Pr制御下のp152からのコア遺伝子をp154
の α -遺伝子の多クローニング部位に挿入した。p15
50 4 DNAを制限酵素Bcl IとAva Iで消化した。この切

断により生じた介在DNAフラグメントは、大部分のC I遺伝子およびP rプロモーターにコア遺伝子を加えたものを有するがコア遺伝子の4つの3'-末端コドンを有しない。このDNAフラグメントをアガロースゲル電気泳動法により精製した。プラスミドp154を制限酵素BclIおよびXmaIで消化し、介在片を除去し、p152からのBclI - AvaI DNAフラグメントと置換した。これゆえ、4つの末端3'コドンのないP r制御下のコア遺伝子は、HBVコア抗原- α 融合ペプチドを発現する枠内遺伝子融合を生成するp154の α -領域の多クローニング部位に挿入された。この新しいコア- α を発現するプラスミドをプラスミドp157と称する。融合ペプチドを精製し、実施例3の方法に類似する方法で肝炎コア抗原用イムノアッセイ(immunoassay)を構築するために抗体とともに使用可能である。

【0178】実施例5：ヒト絨毛性ゴナドトロピンのための免疫検定

1. 製剤 組換法によるヒト絨毛性ゴナドトロピン酵素ドナー融合ペプチド

この実施例は、ヒト絨毛性ゴナドトロピン(β -hCG) *20

(a) hCGS1 (62 mer)

5' AATTCCAGGACTCCTCTTCCTCAAAGGCCCCCTCCCCCCCAGCCTTC
CAAGCCCCATCCCCGACTC3'

(b) hCGS2 (37 mer)

5' CCGGGGGCCCTCGGACACCCCCGATCCTCCCACAATAAG3'

(c) hCGN1 (62 mer)

5' CCGGGAGTCGGGATGGGCTTGGAAAGGCTGGGGGAGGGGCTTTGA
GGAAGAGGAGTCCTGG3'

(d) hCGN2 (37 mer)

5' TCGACTTATTGTGGGAGGATGGGGTGTCCGAGGGCC3'

【0182】DNAフラグメント(a)と(b)を連結し、フラグメント(c)と(d)を連結した。これら2つの相補的DNA鎖は、アニーリングされて以下に示された β -hGGサブユニットの30アミノ酸カルボキシ末端延長を※

Eco RI
AATTCCAGGACTCCTCTTCCTCAAAGGCCCCCTCCCCCCCAGCCTTC
CAAGCCCCATCCCCGACT
GGTCCTGAGGAGAAGGAGTTTCCGGGAGGGGGCTGGGAAGGTTGGGTAGGGCTGA

Apal
Sma I
CCCCGGGGCCCTCGGACACCCCCGATCCTCCCACAATAAG
GGGGCCCCGGGAGCCCTGTGGGCTAGGAGGGTCTTATTCAAGCT
Ava I

【0184】DNAフラグメントは、次の翻訳終止コードンTAAの3'端に5' Eco RI制限酵素部位およびSal I制限酵素部位を含む。

*のための免疫検定に使用する β -hCG融合ペプチドの構築を示す。

【0179】hCGは、 α (16,000ダルトンMW)および β (22,000ダルトンMW)と呼称される2つの非共有結合性結合サブユニットから成る糖タンパク質である。 α サブユニットはhCGおよび関連する糖タンパク質、ロイドロビン(LH)、チロドロビン(TSH)およびフォリドロビン(FSH)に共通である。これらホルモンの β サブユニットは、別個のものであるけれども、高度のアミノ酸相同性を有する。しかしながら、hCGの β サブユニットは、カルボキシ末端に非反復の30のアミノ酸を含んでいる。

【0180】この非反復配列は、組換えDNA技術により構成された。4つのDNAフラグメントは、アプライドバイオシステムズインコーポレーテッド(Applied Biosystems, Inc)社のモデル380A DNAシンセサイザ(実施例1、1.4で説明した)で合成され、次の配列を有する:

【0181】

【化12】

※コードするDNAフラグメントを形成した:

【0183】

【化13】

【0185】このDNAフラグメントを実施例4で製作したプラスミドp154に挿入した。プラスミドp154をEco RIおよびSal Iで切断し、酵素ドナー(E

D) 遺伝子から ω -領域を除去し、アガロースゲル精製した。EcoR I - Sal I β -hCG DNAフラグメントをゲル精製した p154ベクターと連結した。得られたプラスミド、p166と称するは、ED- β hCGカルボキシ末端融合ペプチド(図28参照)をコードする遺伝子を含む。酵素ドナーペプチドED166は93のアミノ酸を含む；下記のようにアミノ酸の1～63番目は α -ドナードメインをコード化し、アミノ酸の64～93番目は β -hCGカルボキシ末端をコード化する：

【0186】

【化14】

5	10
Met Asp Pro Arg Ala Ser Ser Asn Cys Ser	
15	20
Cys Asn Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg	
25	30
Arg Asp Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Glu	
35	40
Leu Asn Arg Leu Ala Ala His Pro Pro Phe	
45	50
Ala Ser Trp Arg Asn Ser Glu Glu Ala Arg	
55	60
Thr Asp Arg Pro Ser Gln Gln Leu Arg Ser	
*64 65	70
Leu Glu Phe Gln Asp Ser Ser Ser Lys	
75	80
Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser	
85	90
Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile	
Leu Pro Gln	

【0187】第2 β -hCG融合ペプチドを第1に次の配列のDNAフラグメントを合成することにより構築した：

【0188】

【化15】

CGCGAATTCTAGATAAATGAG	(21 mer)
TAGCGCTTAAGATCTATTTACTCAGCT	(27 mer)
Pvu I Eco RI	Sal I

【0189】プラスミド p154をBamH IとPvu Iとで切断し、小さな α -ドナー領域をゲル精製した。BamH I - Pvu I フラグメントをDNA合成フラグメントと連結した。このフラグメントをBamH I - EcoR Iで切断し、より小さな α -領域ドメインを p166のBamH I - EcoR I α -ドメインで置換した。得られたプラス

ミド、p175と称するは、85アミノ酸の酵素ドナー(ED175)をコード化する。下に示すように、アミノ酸の1～55番目は α -ドナードメインをコード化し、アミノ酸の56～85番目は β -hCGペプチドのタンパク質をコード化する：

【0190】

【化16】

5	10
Met Asp Pro Arg Ala Ser Ser Asn Cys Ser	
15	20
Cys Asn Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg	
25	30
Arg Asp Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Glu	
35	40
Leu Asn Arg Leu Ala Ala His Pro Pro Phe	
45	50
Ala Ser Trp Arg Asn Ser Glu Glu Ala Arg	
55	*56
Thr Asp Arg Glu Phe Gln Asp Ser Ser Ser	
65	70
Ser Lys Ala Pro Pro Ser Leu Pro Ser	
75	80
Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr	
85	
Pro Ile Leu Pro Glu	

30 【0191】 β -hCGカルボキシ末端配列に融合した他の α -ドナードメインは、実施例1、1.4および図15に記載したH6 α -ドナードメインと同じアミノ末端を共有する。ED H6を含むプラスミド p169をBamH IとEcoR Iで切断し、直線状ベクターをゲル精製した。合成DNAフラグメント、H6 PM、は次の配列であり、プラスミド p169に挿入された。

【0192】

【化17】

40	<u>Sma</u> I <u>Sac</u> I
	GATCCCCGGGCGAGCTCC
	GGGCCCCGCTCGAGGTTAA
	<u>Bam</u> H I 塩基↑ 変更

50 【0193】この合成DNAフラグメントの挿入はEcoR I部位を破壊したがアミノ酸配列を変化させなかつた。それゆえ、得られたプラスミドはEcoR I部位を有しない。 α -ドメインをBamH IおよびPvu Iでの消化によりこのプラスミドから除き、p154のBamH IおよびPvu Iでの消化(p175の構成で上記に記述)の

後、p154中へ置換してp174を形成した。

【0194】プラスマドp174は、51アミノ酸の α -ドナードメインをコード化し、酵素ドナーの α と ω 領域の間にEcoRI部位を有する。 α -ドナードメインをBamHIとEcoRIでの消化によりp174から除き、ゲル精製した。プラスマドp166をBamHIとEcoRIで消化し、p174からの α -ドナードメインをp166に挿入した。得られたプラスマドp177は、カルボキシ末端 β -hCG DNA フラグメントに融合した α -ドナードメインを含む。この酵素ドナーペプチドED177は81のアミノ酸を含む。このように、ED177はED175より4つのアミノ酸だけ短いものである。

【0195】2. ヒト絨毛性ゴナドトロピン検定

この実施例は、ヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)のための高感度な均質系のクローン化酵素ドナー免疫検定を示す。さらに、この実施例において第2抗体(ウサギ抗-hCG)の付着はEA22との相補の抑制効果を高める(以下の実施例9を参照)。

【0196】 β -hCG酵素ドナーを実施例5、1.に記載したようにして構築した。この実施例において、ED175を酵素ドナーとして使用した。

【0197】免疫検定は微小力価形態を使用して行なった。50 μ lの適切な濃度のhCG(1×10³、3×10³および5×10³ mIU)；50 μ lの1:100希釈ポリクローナルウサギ抗-hCG抗体(ロットナンバー01-302-57、イムノサーチニュージャージ州トムスリサーチ(Immunosearch, Toms River, NJ))および50 μ lのED175(1×10⁻⁸M)を加えて免疫検定を行なった。全ての希釈度はPM2緩衝液におけるものであった。反応混合物を37°Cで30分間インキュベートした。50 μ lの1:10希釈液のヤギ抗ウサギ抗体を加え(アンチボディーズインコーポレーテッド、カリフォルニア州ディビス(Antibodies, Inc., Davis, CA))、そして反応混合物を37°Cで30分間インキュベートした。そしてその混合物を50 μ lの酵素アクセプターEA22(1×10⁻⁷M)およびONPG基質(5mg/ml)と反応させた。微小力価プレートを37°CでインキュベートしそしてOD₄₁₄を測定した。

【0198】結果を図29に図面で示した。この実施例は、均質系の免疫検定の使用に適する服用量-応答曲線

を示す。この検定は腫瘍マーカーとしてまたは妊娠の指示薬のいずれかとしてhCG用テストとして使用し得る。

【0199】実施例6：ビオチンに対する検定

この実施例は、検体結合タンパク質として糖タンパク質アビジンを使用するビオチンに関する競合的結合検定を示す。

【0200】アビジン(MW=67,000ダルトン)は、会合定数10¹⁵L/Mで、ビオチン(MW=244ダルトン)と結合する。ビオチンをH6の65番目のリシンおよびN-末端 α -アミノ基と結合させた。酵素ドナーにカップリングしたアビジンがEA23との相補を阻害したかどうかを決定するために、検体結合タンパク質として溶液中のアビジンを使用した。

【0201】ビオチンと酵素ドナーH6とのカップリングを次のように行なった。実施例1に記載したようにして調製した凍結乾燥化H6を0.15mlの0.1Mリン酸ナトリウム、pH 7.5で溶解し、室温で攪拌した。N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)中で10mg/mlのN-ヒドロキシヌクシニミドビオチン(シグマケミカル、セントルイス、ミズーリー州(Sigma Chemical, St. Louis, MO))の5 μ lアルコート2つを加えた。室温で1時間放置後、その溶液を遠心分離処理し、上澄液をpH 9.0の0.1Mホウ酸ナトリウムで平衡にしたバイオゲルP-2(Bio-Gel P-2)(0.6×1.6cm)サイジング(バイオラッドラブス、リッチモンド、カルフォルニア(Bio-Rad Labs, Richmond, CA))に加え、同じ緩衝液で溶出させた。10滴の分画を集め、ビオチニル-H6結合体を含む分画(すなわち、相補活性)をプールした。

【0202】予備実験において、相補性の阻害に必要なアビジン濃度を決定するために滴定が行なわれた。PM2緩衝液、ビオチン化H6、アビジン、EA23および基質 α -ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシドを微小力価プレートに加えた。37°Cで15分間後、414nm(OD₄₁₄)における光学密度を測定した。表7は、それらの結果を示す。このデータは、0.5 μ gのアビジン(7.5×10⁻¹²モル)が相補反応を75%阻害することを示す。

【0203】

【表7】

アビジン³への結合による相補性の抑制

ウェル	アビジン (μ g)	OD ₄₁₄
1	0	0. 545
2	0. 1	0. 499
3	0. 2	0. 438
4	0. 3	0. 370
5	0. 5	0. 133
6	1. 0	0. 123

(a) 記載のごとく調製された2. 5 μ lのビオチン化H6; 20 μ lのEA23 ($3. 6 \times 10^{-7}$ M); および100 μ lの基質o-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノサイド (ONPG) (10 mg/ml) を使用した (ウェル当り)。十分なPM2緩衝液を最終容積200 μ lになるように各ウェルに加えた。

【0204】遊離D-ビオチン (シグマ ケミカル, セントルイス, ミズーリー州 (Sigma Chemical, St. Louis, MO)) 濃度を変化させて加えて競合的結合曲線を描いた以外は、ビオチン用競合的結合検定を予備実験用に記載した方法で行なった。これゆえ、各ウェルは5 μ lのビオチン-H6: 0. 5 μ gのアビジン; 20 μ lのEA23 ($3. 6 \times 10^{-7}$ M); 100 μ lのONPG (10 mg/ml) 基質、および1~8 μ l D-ビオチン (1 μ g/ml) と十分なPM2緩衝液を加えて全容積約200 μ lとしたものを含む。15分間後、光学密度 (414 nm) を測定した。データを図9の図面で示す。以上のようにこの検定系は、1~8 mgまたは $4 \sim 32 \times 10^{-12}$ Mのビオチン用の良好な検定を提供する。アビジン-ビオチン系 ($K_a = 2 \times 10^{15}$ L/M) は、15分間検定以内で相補性 ($K_a = 1 \sim 2 \times 10^5$ L/M) を制御するのに十分な親和性を有する。

【0205】実施例7: ビオチンのための不均質系の相補性検定

この実施例は、特異検体結合タンパク質としてアビジンを使用するビオチンのための不均質系の検定系を示す。酵素アクセプターはEA23であり、酵素ドナーはビオチンにカップリングしたCNBr2である (以後、CNBr2-ビオチン結合体と称する)。

【0206】CNBr2-ビオチン結合体を次のように合成した: 900 μ gの親水化CNBr2ポリペプチドをpH 7. 5の300 μ lの0. 1 Mリン酸ナトリウム緩衝液に溶解させた。2. 1 mgの[N-ヒドロキシ-(d-ビオチン)スクシミドエステル、またはN-ヒドロキシス

クシミドビオチン]スクシミド活性化ビオチン (シグマ ケミカル コーポレーション、セントルイス、ミズーリー州 [Sigma Chemical Co., St. Louis, MO]) を含む200 μ lアリコートのN,N-ジメチルホルムアミド (DMF) を室温で攪拌しながら200 μ lアリコートづつ加えた。2時間後、反応混合物をpH 9. 0の0. 1 Mホウ酸ナトリウム緩衝液を使用するバイオゲル P-2 (Biogel P-2)カラム (1. 5 × 48 cm) のグラマトグラフィーにかけた。CNBr2-ビオチン結合体を含む分画をEA23との相補反応により同定した。

【0207】アビジン固定化アガロース (アビジン-アガロース、シグマ ケミカル コーポレーション、セントルイス、ミズーリー州 [Sigma Chemical Co., St. Louis, MO]を1 μ l懸濁液当り17. 5ユニット (1ユニットは1 μ gのビオチンを結合する。))仕入品を、低ゲル化温度アガロース懸濁液 (6 mg/ml) で希釈して所定レベルのアビジン-アガロースを得た。

40 【0208】1. アビジン-アガロースによるCNBr2-ビオチン相補活性阻害

20 μ lのCNBr2-ビオチン結合体貯蔵品 (5 × 10⁻⁷ M)、90 μ lのPM2バッファーおよび20 μ lの各種希釈度のアビジン-アガロースをエッペルドルフ (eppendorf) バイアル (小びん) 中で充分に混合し、室温で10分間インキュベートした。その後、バイアルを5分間遠心分離機にかけて100 μ lの上澄液を各バイアルから除いて各々10 μ l EA23貯蔵品 (1. 5 × 10⁻⁶ M) を含む微小力価ウェルに入れ、37 °Cで15分間インキュベートした。その後、基質ONPG (10

mg/mlのものを $100 \mu l$) を加え、414 nmにおいて各ウェルの吸光度を 37°C で 30 分後測定した。それらの結果を図 10 の図面で示す。

【0209】2. 固定化アビジンに対する CNBr 2-ビオチン結合体とのビオチンの競合

上記のごとく決定した力値を使用して、ビオチン投与量応答曲線は、下記のようになる。20 μl のアビジン-アガロース懸濁液 (全量 0.35 ユニット) および 90 μl の各種レベルのビオチンを含有する PM2 緩衝液をエッペンドルフバイアル中で充分に混合し、室温で 10 分間インキュベートした。その後 20 μl の CNBr 2-ビオチン結合体貯蔵品 ($5 \times 10^{-7} M$) を加え、充分に混合し、室温で 10 分間インキュベートした。バイアルを 5 分間遠心分離機にかけ、100 μl の上澄液を各バイアルから除いて各々 10 μl EA 23 貯蔵品 (1. $5 \times 10^{-6} M$) を含有する微小力値ウェルに入れ、37°C で 15 分間インキュベートした。基質 ONPG (10 mg/ml のものを 100 μl) を加え、各ウェルの吸光度を 414 nm で、37°C で 30 分間インキュベートした後に測定した。投与量応答曲線を図 11 の図面*20

* で示す。そのような曲線は、未知サンプル中のビオチン量を定量するために使用し得る。

【0210】実施例 8：ジゴキシンのための酵素免疫検定

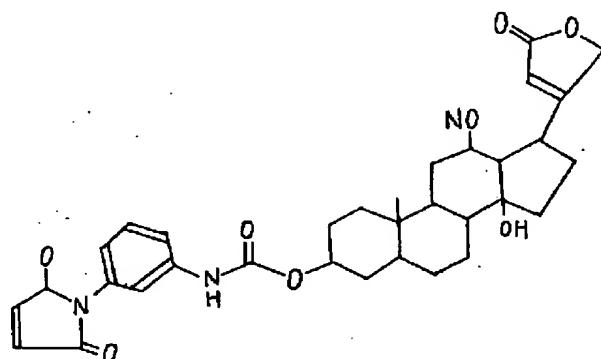
この実施例は、検体が強心性ジギタリス グリコシドジゴキシンであるエンザイム イムノアッセイ (酵素免疫検定法) について示す。検体結合タンパク質は、ジゴキシンに特異な抗体である。さらにこの実施例は、検定の作用機構がカストロおよびモンジ (Cartro and Monji) により記載された β -ガラクトシダーゼを使用する立体障害エンザイムイムノアッセイとは類似していないことを示す (1981, メソッドス イン エンザイモロジー 73: 523-42 (Methods in Enzymology 73: 523-42))。

【0211】1. ジゴキシン-H6 結合体の調製

下式で表わされるジゴキシゲニン、特に 3- α -(β -マレイミドフェニルカルバミル) ジゴキシゲニンのウレタン誘導体 [以後、「ジゴキシン-マレイミド付加物」と称する] を次のように調製した。

【0212】

【化18】



【0213】 マグネット搅拌装置、アルゴン入口および還流冷却器を備えた、乾燥 10 ml 丸底フラスコへ、3-カルボキシフェニルマレイミド (6.7 mg または 0.307 ミリモル)、乾燥ベンゼン (3 ml) および乾燥トリエチルアミン (0.043 ml または 0.307 ミリモル) を加えた。混合物を 30 分間還流した。アリコートの赤外線スペクトル分析 (IR) はカルボニルアジド (2150 cm^{-1}) への転化を示した。ジゴキシゲニン (8.0 mg または 0.205 ミリモル) および乾燥テトラヒドラフラン (2 ml) をその後反応混合物に加えた。3.5 時間の還流後、反応混合物を酢酸エチル (100 ml) で希釈し、50 ml の冷却 1% NaOH 水溶液で一度洗浄し、50 ml 鮎和 NaHCO₃ 水溶液で一度洗浄した。その後、有機相を無水 MgSO₄ で乾燥し濾過し、溶媒をロータリーエバポレータを使用して除いた。残留物を約 1~2 ml のアセトンに溶解し、2 つの調製用薄層クロマトグラフィー (TLC) プレート (1500 ミクロン シリカゲル アナルティック ユニプレート、アナルティック、ネットワーク、デラエア (1500 micron silica gel Anal 50

techuniplate, Analtech, Newark, DE) にかけた。アセトンの蒸発後、プレートを 80/20 = 酢酸エチル/ベンゼンで溶出した。未反応ジゴキシゲニンをプレートから、プレートからの補正 UV 活性帯をこすり取ることにより除き、30 ml の酢酸エチルで 3 回洗浄した。この方法を上記ジゴキシゲニンの次の二つのスポットに繰り返した。この精製は、ジゴキシゲニン (2.6 mg)、好適な产品ジゴキシン-マレイミド付加物 (3.1 mg または未反応出発物質に対して 37% の収率) および 12- α -(β -マレイミドフェニルカルバミル) - ジゴキシゲニン (2.8 mg または未反応出発物質に対して 33% の収率) を与えた。

【0214】 薄層クロマトグラフィーは、2.5% MeOH/CH₂Cl₂ 中でジゴキシン-マレイミド付加物純度を確かめるために実施された。もしさらに精製が必要であれば、3% MeOH/CH₂Cl₂ (2 溶離) による調製用 TLC によって最高に達成される。ジゴキシン-マレイミド付加物は、次のスペクトル特性を示した：

【0215】

* * 【化19】

IR(nujol mull): 3490, 3350, 1805, 1760, 1725, 1700, 1615, 1550, 1460, 1305, 1240, 1160, 960, 935, 905, 880, 840, 810, 790, 710 cm^{-1} . (NMR, 核磁気共鳴 アセトン d_6): 0.8(3H, s), 0.93(3H, s), 3.38(1H, brs), 3.40(1H, q, $J=4.78\text{Hz}$), 4.84(2H, t, $J=1.5\text{Hz}$), 5.00(1H, m), 5.78(1H, t, $J=1.5\text{Hz}$), 6.98(s, 2H), 6.8-7.7(4H, m), 8.75(1H, br s). マススペクトル(CDI-NH₃): 622(M+NH₄⁺), 605(M+H⁺), 587(M+H⁺-H₂O), 391, 373, 355, 337, 214, 191, 189.

【0216】ジゴキシン-マレイミド付加物をベックマン モデル332高性能液体クロマトグラフィーシステム(ベックマン インストルメンツ, インコーポレーテッド, パロ アルト, カルフォルニア(Beckman Instrument, Inc., Polo Alto, CA))を使用するRP-8シンクロパック 250×10mm I. D. (シンクロム, インコーポレーテッド, リンデン, インジアナ(SynChrom, Inc., Linden, ID))でさらに精製した。勾配溶離を1.5ml/分の流速で60分かけてH₂O中の0~80%アセトニトリルで実施した。ジゴキシン-マレイミド付加物をプールし、凍結乾燥した。

【0217】その後、精製ジゴキシン-マレイミド付加物を上記のごとく調製した酵素ドナーH6とカップリングさせ、酵素ドナー-検体結合体であるジゴキシン-H6を形成した。H6(1.5mg)をpH6.0で240μlのアセトニトリル-50mMリン酸ナトリウム(3:2)に溶解した。ジゴキシン-マレイミド付加物(1.0mg)を37℃で2時間保持した反応混合物に直接加えた。カップリング反応が完了後、60μlアリコート混合物をボンダパック(登録商標)フェニルカラム(Bondapak(登録商標)Phenyl column)10×30cm(ウォーターズ アソシエーツ, ミルフォード, エムエイ(Waters Associates, Milford, MA))に注入した。カラムを60分間H₂O中の勾配0~80%のアセトニトリル、0.1%トリフルオロ酢酸で展開した。酵素ドナー活性を含有するサンプルをプールした。

【0218】2. ジゴキシンのための免疫検定法

本発明の方法により調製された酵素免疫検定系において、酵素アクセプターおよび酵素ドナー結合体(すなわち、検体にカップリングした酵素ドナー)濃度の異なる組合せは、相補プロセスにより与えられたβ-ガラクトシダーゼ濃度を生じるために使用し得る。質量作用の法則は、酵素アクセプターの比較的高濃度状態で、相補プロセスにおける抗体の阻害効果が緩和されることを必要とする。このことは、検体、例えばジゴキシンの変化する濃度に対し投用量応答特性が平坦またはないということにより明らかである。反対に、酵素ドナー結合体の比較的高濃度状態(抗体に対して)で、相補プロセスにお

ける抗体の阻害効果も失なわれる。後者の状況は、投用量応答特性が平坦またはないということにより、そして高められたバックグラウンドによっても明らかである。

【0219】この実施例は、従来のエンザイムイムノアッセイの如く酵素アクセプター、酵素ドナー、および特異抗体の相対濃度が検体に関する診断学的検定の使用に好適な精度(傾き)および感度を有する服用量応答特性を示す検定をつくり出すために規定されなければならないことを示す。

【0220】微小力価形態を使用する一連の実験において、システム感度をジゴキシン-H6酵素ドナーとEA23酵素アクセプター濃度の異なる組合せを使用して決定した。

【0221】各々50μlのジゴキシン(検体)、酵素ドナー-H6ジゴキシン結合体、ジゴキシンに特異な抗体(抗ジゴキシン)および酵素、酵素アクセプター(EA23)および基質としてのo-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシド(ONPG)5mg/リットルを含む溶液の4つを順次加えて検定を行なった。全ての希釈はPM2緩衝液[0.5M Na₂HP₄、1mM MgSO₄、0.18mM MnSO₄、1mM EDTA、0.02% Na₃および0.05%のトゥーン20(Tween 20)(ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、シグマケミカルコーポレーション、ミズーリー州セントルイス(polyoxyethylenesorbitan monolaurate, Sigma Chemical Co., St Louis, MO)]において行なった。ジゴキシン検体濃度は、0, 1, 10, 10

0, 200, 500および1000ng/mlであった。ジゴキシンに特異な抗体は、ジゴキシン結合体を次のようにウサギ中に注入することにより得られた: 2.0mlの完全フロイント(Freund)アジュバント(補助薬)の全容積中の50μgの結合体を使用して初回の筋内注入を行なった。ブースター(筋内)を1.0mlの完全フロイントアジュバントの全容積中の25μgの結合体でもって4週間間隔で投薬した。50mlの血を初回の注入から90日間、2週間に亘り集めた。内側動脈の切開または耳周縁静脈の切開により集めた。血液を凝結させ、30分間1000×gで遠心分離機にかけたのち上澄液として

25ml血清/50ml血液を回収した。

【0222】結果を図12および図13に図面で示す。図12および図13の投与量応答曲線を比較すると酵素アクセプターまたは酵素ドナー結合体のいずれかの濃度を選択的に減少すると急勾配となり、それゆえにさらに感度の高い投与量応答曲線となることが判る。

【0223】3. ジゴキシン免疫検定の機構

抗ジゴキシン抗体と酵素ドナージゴキシン結合体との反応が、重合した β -ガラクトシダーゼ酵素による基質転化よりも相補プロセスを阻害するかどうか決定するために、相補プロセスは一連の実験において抗体の添加前にプロセスを完了させられた。

【0224】実験処方は次のようにあった：300 μ lのPM2緩衝液とジゴキシン-H6結合体を60分間150 μ lの酵素アクセプターEA23(4.1×10⁻⁶*)

サンプル	光学密度 インキュベーション時間 7分間	16分間
抗ジゴキシン ^a	0.475	0.947
NRS ^b	0.466	0.954
PM2 ^c	0.457	0.936
基質ブランク	0.500	0.057

(a) 抗ジゴキシンはラビット539をさす(50 μ l: PM2緩衝液で1:100希釈)。

(b) NRSは正常ウサギ血清をさす(50 μ l: PM2バッファーで1:100希釈)。

(c) PM2緩衝液: 0.5M Na₂HPO₄、pH 7.0、1mM MgSO₄、0.18mM MnSO₄、1mM EDTA、0.02% NaNO₃、0.05%トウーン(Tween) 20。

【0226】表8に示したように、あらかじめ重合した β -ガラクトシダーゼ(ジゴキシンH6およびEA23酵素アクセプターの完全相補)による基質転化を抗体は阻害しない。このようにエンザイム アッセイを使用して観察された基質転化の減少は抗体の阻害による相補の結果であり酵素基質転化の減少の結果ではない。それゆえに、本発明による検定法の作用機構は、カストロおよびモンジ(Castro and Monji)により記載された β -ガラクトシダーゼを使用する立体障害エンザイムイムノアッセイとは類似しない(1981, メソッズ イン エンザイモロジー73: 523-542(1981, Methods in Enzymology 73: 523-542))。

【0227】3. 1. 酵素アクセプターを変化させることによる抗ジゴキシン抗体の相補性におよぼす効果

*M)と反応させた。このことは相補性が完了することが認められた。上記反応混合物のアリコート(125 μ l)を除き、ウサギ抗ジゴキシン抗体(PM2緩衝液で1:100に希釈した)のアリコート(50 μ l)に加えた。反応混合物をその後30分間インキュベートした。この期間の終了時にONPG基質(最終濃度1mg/ml)を加え、反応混合物を37°Cでインキュベートした。反応混合物の光学密度を37°Cでインキュベートし、7および16分後に測定した。(PM2緩衝液)

10 1:100に希釈した正常ウサギ血清またはPM2緩衝液のいずれかの50 μ lをウサギ抗ジゴキシン抗血清の代りに加えた以外は比較試験管を同様に処理した。結果を表8に示す。

【0225】

【表8】

光学密度

インキュベーション時間

7分間 16分間

0.475 0.947
0.466 0.954
0.457 0.936
0.500 0.057

一連の実験において、ジゴキシンに対する特異抗体の阻害効果を実施例2、2および実施例8、1の記載のごとく調製した3つの酵素アクセプターおよび酵素ドナージゴキシン-H6結合体を使用して測定した。

【0228】反応混合物を次のように調製した：50 μ l PM2緩衝液；50 μ lのPM2緩衝液中のジゴキシン-H6結合体の適切な希釈度(1:20, 1:40, 1:80)；50 μ lの適切な抗体(すなわち抗ジゴキシン抗体または正常ラビット血清のいずれか)および酵素アクセプター(1×10⁻⁷M EA14, EA20またはEA22)および基質o-ニトロフェノール- β -D-ガラクトピラノシド(ONPG)(5mg/ml)の50 μ lの適切な混合物を微小カバープレートに加えた。プレートを37°Cで所定期間インキュベートした。414nmに

おける光学密度を5分間間隔で45分間測定した。

【0229】このシステムの抗体相補阻害効果は、酵素アクセプター欠失の大きさに関係すると思われる。アミノ酸の13-40番目(図7参照)を欠失し、かつこの実験で試験した最も大きな欠失である酵素アクセプターEA22は、抗体により最も阻害されなかった。アミノ酸の30-37番目(図7参照)を欠失し、かつ試験されたグループの中で最も小さな欠失である酵素アクセプターEA14は、抗体により最も阻害された。アミノ酸の26-45番目(図7参照)から成り、大きさがEA22とEA14の中間であるEA20は、相対的にそれらの中間で阻害された。しかしながら、EA20の自然な相補効率は、EA14またはEA22のいずれのそれよりも少ない。酵素アクセプターは、2つの基準を満たさなければならない:(a)自然な相補効率(例えば、EA14およびEA22は、等モル濃度において図7に示された他のものよりさらに効果がある);および(b)相補特異的検体結合タンパク質の阻害能。

【0230】実施例9: 第2抗体のジゴキシン酵素免疫検定における効果

上記実施例7、3に示した結果は、抗ジゴキシン抗体の本発明による酵素ドナージゴキシン結合体へのカップリングが酵素アクセプターと酵素ドナー結合体の相補速度を遅くするということを示す。しかしながら、そのようなカップリングは、完全には相補を妨害しない。実施例8、3で述べたように、このシステムは、酵素アクセプターと酵素ドナー結合体のほぼ15分間のインキュベー

ションで最も感度が高くなる。

【0231】そのシステムは、約15分間で最大吸収差に達する。その時抗ジゴキシン抗体が存在するシステムにおいて β -ガラクトシダーゼ濃度は、抗体が存在しないシステムまたはジゴキシン抗体が中和されるシステムの濃度と同じである(例えば、高ジゴキシンレベル)。 β -ガラクトシダーゼ濃度が同じであるため、基質転化率も同じである。付加的な吸収差は生じない。抗体の相補効果を制限する現象は、投与量応答曲線に対し狭い吸収範囲、平坦な傾き特性およびある診断法に対して不十分な検定感度を示す方法を提供する。

【0232】次の実施例は、抗ジゴキシン結合体抗体に特異な第2抗体の付着が相補阻害を強めることを示す。

【0233】1. 完全第2抗体の付着

一連の実験において、 $50\mu\text{l}$ のウサギ抗ジゴキシン抗体(1:1000に希釈)を、一組の微小力価ウェル中で $50\mu\text{l}$ のジゴキシン-H6(PH2緩衝液中で1:50に希釈)および0, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 100ng/mlの範囲の $50\mu\text{l}$ のジゴキシンと結合させた。 $50\mu\text{l}$ アリコートの第2抗体製剤(ベチルラボ、モントゴメリー、テキサス州、ヤギ抗ウサギ血清1:50~1:800(Bethyl Lab, Montgomery, TX, goat anti-rabbit serum 1:50-1:800))を各ウェルに加えた。結果を表9から表11に一覧表にする。

【0234】

【表9】

第2抗体の基質転化率に及ぼす効果

希釈 ^b	基質転化率 (OD ₄₁₄ / 時間) ^a							
	0-16分間		16-30分間		35-40分間		45-60分間	
	第2抗体	OD/時間	第1抗体	OD/時間	第1抗体	OD/時間	第1抗体	OD/時間
1. 50	0.002	67	0.004	57	0.005	39	0.006	40
1. 75	0.002	67	0.004	57	0.007	54	0.009	60
1. 100	0.002	67	0.006	86	0.009	69	0.011	73
1. 200	0.003	100	0.007	100	0.012	92	0.013	87
1. 300	0.003	100	0.007	100	0.012	92	0.014	93
1. 400	0.003	100	0.007	100	0.013	100	0.014	93
1. 800	0.003	100	0.007	100	0.013	100	0.014	93

(a) すべての場合において、第2抗体なしで第1抗体を使用する検定系による基質転化率を100%とした。この製剤の測定された割合 (OD₄₁₄ / 時間) は、0-16; 16-30; 30-45; および45-60分において各々 0. 003, 0. 007, 0. 013, 0. 015であった。

(b) 使用した第2抗体は、ヤギ抗ウサギ抗体 (ペチル ラボ、モントゴメリーテキサス (Bethyl Labs, Montgomery TX)) であった。希釈はすべてPM2緩衝液を使用して調製した。第1抗体は、1:1000ですべて希釈したウサギ抗ジゴキシン抗体であった。

【0235】表9に示されるように、第2抗体を抗体-ジゴキシンH6結合体に付着することにより達成される相補阻害効果は、第2抗体の1:50希釈またはそれ以下で最適である。第2抗体の1:200~1:300の 30 希釈において、全ての相乗阻害が失なわれた。第2抗体

ありまたはなしの相補阻害は、この希釈においてまたはそれ以上においても同じである。

【0236】

【表10】

第1 抗体	希釈 ^b	第2抗体の基質転化率に及ぼす効果			
		基 質 転 化 率		0-16分間 16-30分間	
第2 抗体	OD/時間	% 最大	OD/時間	% 最大	
R α Dg	—	0.002	50	0.007	70
NRS	—	0.004	100	0.010	100
R α Dg*	1:5	0.004	100	0.007	54
NRS	1:5	0.004	100	0.013	100
R α Dg*	1:10	0.004	100	0.005	39
NRS	1:10	0.004	100	0.013	100
R α Dg*	1:20	0.003	60	0.003	25
NRS	1:20	0.005	100	0.012	100
R α Dg	1:40	0.002	40	0.003	25
NRS	1:40	0.005	100	0.012	100
R α Dg	1:80	0.001	20	0.004	36
NRS	1:80	0.005	100	0.011	100
R α Dg	1:160	0.002	50	0.006	50
NRS	1:160	0.004	100	0.012	100

* ウエル中の製剤

(a) 第1抗体は、PM2緩衝液で1:1000に希釈したウサギ抗ジゴキシン (R α Dg) または正常ラビット血清 (NRS) のいずれかであった。

(b) 第2抗体は、ヤギ抗ウサギ抗体を示す。

第1 抗体	第2 抗体	希釈 ^b	第2抗体の基質転化率に及ぼす効果			
			基質転化率		30-45分間	
			OD/時間	%最大	OD/時間	%最大
R α Dg	-		0.010	71	0.010	77
NRS	-		0.014	100	0.013	100
R α Dg*	1:5		0.003	23	0.003	23
NRS	1:5		0.013	100	0.013	100
R α Dg*	1:10		0.003	21	0.003	21
NRS	1:10		0.014	100	0.014	100
R α Dg*	1:20		0.003	21	0.003	21
NRS	1:20		0.014	100	0.014	100
R α Dg	1:40		0.003	21	0.004	29
NRS	1:40		0.014	100	0.014	100
R α Dg	1:80		0.006	43	0.006	43
NRS	1:80		0.014	100	0.014	100
R α Dg	1:160		0.009	60	0.009	60
NRS	1:160		0.015	100	0.015	100

* ウェル中の製剤

(a) 第1抗体は、PM2緩衝液で1:1000に希釈したウサギ抗ジゴキシン (R α Dg) または正常ラビット血清 (NRS) のいずれかであった。

(b) 第2抗体は、ヤギ抗ウサギ抗体を示す。

【0238】表10および表11で示されるように、第2抗体なしでは基質転化率（すなわち、 β -ガラクトシダーゼ濃度）は30分間以内で最大70%に達した。

1:40の希釈で第2抗体を有する場合には、基質転化率は最大約25%であった。第2抗体が1:40希釈よりも大きい場合において、相補阻害効果は、時間とともに基質転化率が増加することによって明らかのように、減少しした。

【0239】1:40またはそれ以上の希釈において、基質転化率が増加するという効果がある。

【0240】試験した第2抗体の全濃度において基質転化率（すなわち β -ガラクトシダーゼ濃度）は、システムが許容する β -ガラクトシダーゼの最大濃度以下のレベル（例えばNRSは第2抗体に代わる）で直線状となった（すなわち、新規 β -ガラクトシダーゼを產生しない）。このことは、第2抗体の結合が第1抗体の立体障害を高め、かつ結合する酵素ドナー集団による相補を完全に妨げるということを示す。

【0241】1.1. 投与量応答：EA14とジゴキシ

シ-P6

他の一連の実験において、エンザイムイムノアッセイの感度を0, 1, 10, 100, 1000 ng/ml範囲の濃度のジゴキシン（検体）、酵素アクセプターEA14、ウサギ抗ジゴキシン抗体および第2抗体としてのヤギ抗ウサギ抗体を使用して測定した。これらの実験においてジゴキシン-H6結合体（実施例8）およびEA14酵素アクセプターで記載した方法と類似方法で調製した酵素ドナージゴキシン-P6を様々な組合せの濃度で使用した。各ケースにおいて次の方法を使用した：微小力価形態において、各々50 μ lのジゴキシン-P6、遊離ジゴキシン検体および抗ジゴキシン抗体を順次加えた。その後、50 μ lのヤギ抗ラビット（1:80）を加えた。プレートを室温で10分間インキュベートした。その後、各々50 μ lの適切な希釈の貯蔵品EA14

(2.64 \times 10⁻⁵M) およびo-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド(galactopyranoside)基質 (5 mg/ml) を加えた。プレートを37°Cで再びインキュベートし、反応混合物の吸光度を15分、30分に測定し

た。基質ブランクの吸光度を全サンプルから引いた。

【0242】図14に示された図の結果は、ジゴキシン検定使用に適する服用量応答曲線を示す。

【0243】2. 第2抗体フラグメントの付着

第2抗体が第1抗体-酵素ドナー結合体とカップリングしたときに観察された阻害の高揚が沈降素複合体中の酵素ドナー結合体の立体障害またはエントラップメントに帰するかどうか決定するために、ヤギ抗ウサギ免疫グロブリンの単価Fabフラグメント（約50,000ダルトンMWの抗原結合フラグメント）を第2抗体として使用した。Fabフラグメントが抗原と架橋できないために沈降または凝集反応を誘導することはできない。この製剤で観察された相補のいかなる阻害も、相補に対する高められた立体効果によるものであって結合体の高められたエントラップによるものではない。

【0244】微小力値プレート形態において、各々 50 μ 1 のジゴキシン (0, 1, 4, 10, 1000 ng/m*)

FAB フラグメント効果

基 質 転 化 素

第2抗体製剤^a の選択^b

0	1	4	10	1,000
56.7	66.3	81.9	94.0	100
95.4	91.3	88.7	97.1	100
62.8	68.1	75.2	89.4	100
57.6	67.6	75.5	87.1	100
66.2	73.8	80.0	90.3	100
69.7	75.6	82.3	91.5	100
77.4	78.5	83.1	92.1	100
81.6	83.5	85.1	94.8	100

(a) 第2抗体製剤を全て1:4000希釈の第1抗体を使用して試験した。

(b) ヤギ抗ウサギ免疫グロブリン抗血清 (ペチル ラブス, モントゴメリー, テキサス (Bethyl Labs, Montgomery, TX))。

(c) なしは第2抗体を使用しなかったことを示す。正常ウサギ血清の 1 : 80 稀釀は試料中の第2抗体と置き換えた。

(d) Fabヤギ抗ウサギ IgGは、HおよびL S_pから得られたFabフラグメントを示す(カッペル 0412-0081 ロット ナンバー23167 (Cappel 0412-0081 Lot # 23167)) (カッペル ラボラトリーズ, ウエスト チェスター, ペンシルバニア (Cappel Laboratories, West Chester, Pa.))。

【0247】表12に示すようにヤギ抗ウサギ免疫グロブリン(Fabフラグメント)が第1抗体酵素ドナー結合体とカップリングする際に明らかに相補性が減少する。

Fabフラグメントにより誘導される相補の障害は、抗体

全部を使用する際に観察された阻害とほぼ同等である。

【0248】表12に示されるように第2抗体は、高投与量（すなわち、過剰の遊離検体により引き起こされるより少ない抗体酵素ドナー相互作用）より小投与量（す

なわち、より大きな抗体／酵素ドナー相互作用)において大きな相補阻害効果を示した。

【0249】F ab濃度が減少すると、相補阻害が直線的に減少した。表9でそのままの分子は、1:40より大きな希釈で有効に第2抗体を減少することを示した。同様に、F ab製剤の1:40の希釈で同様の現象が始まることが判る。

【0250】3. 検体特異抗体による相補阻害: ED-ジゴキシン結合体の比較

特異的検体抗体による相補活性の特異的阻害に関しての、各種ED-ジゴキシン結合体の比較を行なった。下に示す実験においてEA22をカップリングした酵素ドナーの相補活性を標準化した。各種EDのジゴキシン結合体を、カップリング時のpHをpH9.5まで上昇させてジゴキシン-マレイミドを α -アミノ基および α -領域へのシステイン末梢の両方へカップルするED4(2-ジゴキシン)を用いることを除いては前記のように調製した。抗ジゴキシン抗体およびヤギ抗ウサギ抗体濃度の両者を標準化した。その結果を表13に示す。

【0251】

【表13】

検体特異抗体による相補の抑制

酵素ドナー	相補の抑制(%)
ED5	66
ED4 (2-ジゴキシン)	68
ED4	51
H6	37 *
酵素アクセプター (EA22)	$0.625 \times 10^{-7} M$
第1T4抗体	1/1200
サリチル酸塩	10 mM
酵素ドナー (ED4-T4)	1/276
第2ヤギ抗ウサギ抗体	1/200
ONPG	0.51 mg/ml

【0255】900秒で読みとった。各患者のT4サンプルを使用する際にはO.D./分の変化は、個々の患者のサンプルを分けてO.D.₄₀₅で±50mO.D.投入量によってプロットすべきである。図26は、すべてヒト血清中で調製された検量物質によるT4検定を示す。900秒での検量物質間の吸光度の変化を血清T4濃度に対してプロットする。

【0256】ジゴキシン検定をED5およびEA22およびベーカーエンコリー(Baker ENCORE (登録商標))遠心分離分析器を用いて改善した。ジゴキシン標準がヒ

* 【0252】実施例10: 第2抗体を使用する改良されたチロキシンおよびジゴキシン検定

チロキシンおよびジゴキシン酵素相補性免疫検定を第2抗体を使用して行なった。

【0253】さらにチロキシン(T4)検定をEA22およびED4を使用レベーカーインスツルメンツ(Baker Instruments) (アレンタウン、ペンシルバニア(Allentown, PA)製遠心分離分析器、エンコア(ENCORE (登録商標))で改良した。その検定系は、10 μ lの患者の

10サンプル、抗T4抗体およびサリチル酸塩を含んだ100 μ lの酵素アクセプター試薬、および第2ヤギ抗ウサギ抗体および基質o-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノサイド(ONPG)を含む290 μ lの酵素ドナー試薬を含む。その最終システム濃度は表14のようであつた:

【0254】

【表14】

ト血清において調製された。アッセイは、30 μ lの血清、200 μ lのED5-ジゴキシン試薬および100 μ lのEA22試薬を含む。ED5-ジゴキシン試薬は、基質o-ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノサイドおよびヤギ抗ウサギ抗体を含んでいた。EA22試薬はウサギ抗ジゴキシン抗体を含んでいた。最終システム濃度は表15のようであつた:

【0257】

【表15】

血清	
E A 2 2	
E D 5 - ジゴキシン	
第1ジゴキシン抗体	
第2ヤギ抗ウサギ抗体	
O N P G	

9. 1%	
2×10^{-7}	
1 : 1500	
1 : 59, 400	
1 : 200	
0. 5 mg/ml	

【0258】この検定の標準的な曲線を図27に示す。

【0259】実施例11：遺伝子工学的および化学的に合成された酵素ドナーのジゴキシン免疫検定性能比較
化学に合成された成分と遺伝子操作された成分とを使用した酵素免疫検定を比較するために、2つの類似酵素ドナー、すなわち1つは組換DNA技術によるものであり、他は化学ペプチド合成によるもの、を調製した。遺伝子操作により生産したED3（実施例1、1.4参照）およびポリペプチド合成により生産したED3A（実施例1、1.5参照）のアミノ酸配列を図18に示す。これら2つのペプチドの顕著な特徴は、検体への化学カップリングに使用され、図18において星印を付した類似システイン残基（Cys）とED3のアミノ酸番号12と50の間に位置し、ED3Aのアミノ酸番号5と43α間に位置するものを含み野生ータイプβ-ガラクトシダーゼの対応するアミノ酸の6～44番目を含む類似α-ドナードメインである。

【0260】ジゴキシンαED3およびED3Aへの結合を実施例8、1に記載の3-o-[m-マレイミドフェニルカルバミル]ジゴキシゲニンを用いて行なった。ED3、ED3A、ジゴキシン-ED3およびジゴキシン-ED3A製剤を溶離液として0.1%TFAを含む水中の0～80%のアセトニトリル濃度勾配を使用した調製用HPLCヘニルカラム(henylcolumn)【ウォーターズμボンダパック、ウォーターズアソシエート、ミルフォ

ード、マサチューセッツ(Waters μ Bondapak, Water Associates, Milford, MA)）を有する高速液体クロマトグラフィー（HPLC）にかけた。各酵素ドナーのカラム分画を酵素アクセプターとしてM15を使用して実施例1、2.1に記載の相補性を検定した。ED3-ジゴキシンの相対的な相補効率はED3A-ジゴキシンの4倍であった。

【0261】ジゴキシン-ED3およびジゴキシン-ED3Aに対応するカラム分画を別々にプールし、ジゴキシンに関する競合的酵素免疫検定を比較した。

【0262】96ウェル微小力価プレートを使用して検定した。検定は、25μlのヒト血清標準0, 0.5, 1, 2, 4, 10, 100および1000ng/mlジゴキシン、 4×10^{-7} モルM15酵素アクセプターおよびジゴキシン抗体を含む100μlの試薬I、および130μlの試薬IIを含んでいた。試薬IIは、各種希釈されたジゴキシン-ED3またはジゴキシン-ED3A、第2ヤギ抗ウサギ抗体および1.1mg/mlのo-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシドを含んでいた。37°Cにおいて30分間インキュベートした後の結果およびタイターテック(Titertek)微小力価プレートリーダーにおける405nmの読みを表16および表17に示す。

【0263】

【表16】

ED3およびED3Aを用いるジゴキシン検定

結合体希釈	ジゴキシン服用量 $\mu\text{g}/\text{ml}$							
	0	0.5	1	2	4	10	100	1k
ED3 (絶対OD)								
1/100	0.810	0.821	0.855	0.916	0.980	1.088	1.159	1.218
1/200	0.350	0.368	0.386	0.420	0.444	0.508	0.566	0.586
1/400	0.154	0.149	0.163	0.178	0.189	0.230	0.249	0.264
1/800	0.080	0.078	0.084	0.095	0.090	0.114	0.133	0.121
ED3A (絶対OD)								
1/100	0.668	0.656	0.660	0.660	0.668	0.719	0.757	0.777
1/200	0.310	0.306	0.309	0.322	0.329	0.352	0.372	0.375
1/400	0.146	0.146	0.153	0.152	0.151	0.192	0.180	0.180
1/800	0.043	0.039	0.047	0.043	0.048	0.060	0.064	0.052

【0264】

20【表17】

ED3およびED3Aを用いるジゴキシン検定

結合体希釈	ジゴキシン服用量 $\mu\text{g}/\text{ml}$							
	0	0.5	1	2	4	10	100	1k
ED3 (OD)								
1/100	0	0.011	0.045	0.106	0.170	0.278	0.349	0.408
1/200	0	0.018	0.036	0.070	0.094	0.158	0.216	0.236
1/400	0	0.005	0.009	0.024	0.035	0.076	0.095	0.110
1/800	0	0.002	0.004	0.015	0.010	0.034	0.053	0.041
ED3A (OD)								
1/100	-0.012	-0.008	-0.008	0	0.051	0.089	0.104	
1/200	-0.004	-0.001	-0.012	0.019	0.042	0.062	0.065	
1/400	0	0.007	0.006	0.005	0.046	0.034	0.034	

【0265】表16および表17にみられるように、競合的免疫検定がジゴキシン-ED3とジゴキシン-ED3Aの両者で生じた。ジゴキシン-ED3Aを使用するジゴキシンに関する曲線を図25に示す。ジゴキシン-ED3を使用するジゴキシン免疫検定は、ジゴキシン-ED3Aより0.5および1mg/mlの低投与量においてより良好な信号識別性を与える。この差異は、HPLC分析中に検出されたED3A製剤中の不純物の存在によるだろう。

【0266】これらの実験は、抗原抗体反応による β -ガラクトシダーゼポリペプチドの相補の制御に遺伝子操作されたポリペプチドと同様に合成ペプチドが用いられ

ることを示す。化学ポリペプチド合成は、高分子量タンパク質検出を目的とする酵素ドナーを生産するために使用し得る。 α -ドナードメインに融合した免疫学的に反応に富むポリペプチドエピトープをコード化する遺伝子融合物も合成し得る。この解決法の限界は、より大きなポリペプチドを合成する技術の可能性の状況ばかりでなく必要とした α -ドナードメインおよび免疫学的反応性たん白質ドメインの両者の配列に関する知識をもたないことである。

【0267】微生物の寄託について

表18に挙げられたプラスミドを有する次のエシェリキア・コリ(E.Coli)菌株は、インビトロインターナシ

ヨナル, インコーコーポレーテッド, (IVI), アン アーバー, ミシガン州(*In Vitro International, Inc. (IVI), Ann Arbor, MI*) またはザ アグリカルチュラル リサーチ カルチャー コレクション (N R R L), ペオリア, イリノイ州(*the Agricultural Research Culture*) *

エシェリキア	プラスミド	受託番号
•コリ菌株		
E9001	p122	IVI 10034
E9001	p125	IVI 10035
E9001	pF29	IVI 10038
JM83	p150	IVI 10036
JM83	p157	IVI 10037
AMA 1004	pMG14	IVI 10050
AMA 1004	pMG22	IVI 10051
E9001	p169	IVI 10052
E9001	p183	IVI 10053
E9001	p185	IVI 10054
AMA 1004	p175	NRRL-B18006

【0269】エシェリキア・コリ(*E.Coli*)菌株E9001、IVI 10034および菌株JM83、IVI 10037は、それぞれプラスミドp122およびp157を含み、実施例3、1および実施例4で記載した一部のB型肝炎ウィルス表面抗原および α -ドナーの融合タンパク質をコードする遺伝子を有する。エシェリキア・コリ(*E.Coli*)菌株E9001、IVI 10035は、プラスミドp125を含み、実施例1、1. 1に記載のように酵素ドナーをコードする遺伝子を有する。エシェリキア・コリ菌株E9001、IVI 10038および菌株JM83、IVI 10036は、それぞれプラスミドpF29およびp150を含み、実施例1、2の記載のようにp150が酵素アクセプターをコードする遺伝子を有する。エシェリキア・コリ菌株AMA 1004、IVI 10050は、アミノ酸の30~37番目を欠失した β -ガラクトシダーゼタンパク質(酵素アクセプター)に関する遺伝子を有するプラスミドpMG14を含む。図7参照。エシェリキア・コリ菌株AMA 1004、IVI 10051は、アミノ酸の13~40番目を欠失した β -ガラクトシダーゼたん白質(酵素アクセプター)に関する遺伝子を有するプラスミドpMG22を含む。図7参照。エシェリキア・コリ菌株E9001、IVI 10052は、アミノ酸の62番目にシステイン残基、アミノ酸の64番目にリシン残基を有する β -ガラクトシダーゼのフラグメント(ED H6)をコードする遺伝子を有するプラスミドであるp169を含む。実施例1、2参照。エシェリキア・コリ菌株E9001、IVI 10053は、アミノ酸の3

*Collection(NRRL), Peoria, IL) に寄託され、次の受託番号を指定された:

【0268】

【表18】

30

40

番目にシステイン残基を有する β -ガラクトシダーゼのフラグメント(ED3)をコードする遺伝子を有するプラスミドであるp183を含む。実施例1、1. 4参照。エシェリキア・コリ菌株E9001、IVI 10054は、アミノ酸の39番目にシステイン残基を有する β -ガラクトシダーゼのフラグメント(ED5)をコードする遺伝子を有するプラスミドであるp185を含む。実施例1、1. 6参照。エシェリキア・コリ菌株AMA 1004、NRRL B-18006は、実施例6および図28に示したB-hCGタンパク質のカルボキシ末端および α -ドナーの融合タンパク質をコードする遺伝子を有するプラスミドであるp175を含む。

【0270】本発明は、寄託された微生物による範囲に限定すべきではない。なぜならば寄託された実施態様は本発明のある態様の一例を示そうとするものであり、かつ機能的に等価などんな微生物も本発明の範囲内であるからである。事実、さらにここに示しかつ記載する本発明の各種の変形は当業者には前記および添付図面から明らかになるであろう。かかる変形は添付請求の範囲の範囲内に入ることを意味する。

【0271】スクレオチド用に与えられた塩基対(bp)の大きさの全ては概算であり、記述のために使用されることも理解される。

【0272】

【発明の効果】上記したように、本発明の酵素ドナーポリペプチドおよび酵素アクセプターポリペプチドを用いることにより、高い感受性で、150~30,000ダルトンの広範囲の分子量を有する検体の定量分析が可能

50

である酵素相補性検定法が得られる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 β -ガラクトシダーゼポリペプチドを、自然界に知られる欠失変異体M15、M112およびX90と共に図解的に表わすものである。また選択臭化シアン(CNB_r)開裂ペプチドCNBr2、CNBr2/3-41およびCNBr24が表わされる。

【図2】検体カップリングドメインを含む種々の組換えプラスミドの構築を表わすものである。ただし、図2A～Dは一定の比率に拡大して描かれたものではない。

【図3】 α -ドナードメインおよびB型肝炎ウィルス表面抗原(HBV-S Ag)あるいはB型肝炎ウィルスコア抗原からなるタンパク質ドメインからなるN-末端およびC-末端融合タンパク質を図解的に示すものである。

【図4】本発明による典型的な新規のポリペプチド酵素-ドナーのDNAおよびアミノ酸配列を表すものである。図4において、*は、検体へカップリングするのに有用な反応性基を有するアミノ酸を示すものである。

【図5】本発明による典型的な新規のポリペプチド酵素-ドナーのDNAおよびアミノ酸配列を表すものである。図5において、*は、検体へカップリングするのに有用な反応性基を有するアミノ酸を示すものである。

【図6】本発明による典型的な新規のポリペプチド酵素-ドナーのDNAおよびアミノ酸配列を表すものである。図6において、*は、検体へカップリングするのに有用な反応性基を有するアミノ酸を示すものである。

【図7】 β -ガラクトシダーゼ遺伝子の α -領域中に導入される欠失部分を示すポリペプチド酵素-アクセプターを表わすものである。比較のために、公知の欠失変異体M15およびM112も示される。

【図8】天然の β -ガラクトシダーゼ遺伝子DNAおよびアミノ酸配列を示すものである。

【図9】検体-結合タンパク質がアビジンであるビオチンのための均質系の検定法に関する競合的結合曲線を示すグラフである。

【図10】検体-結合タンパク質がアビジンであるビオチンのための検定法に関する競合的結合曲線(投与量応答曲線)を示すグラフである。

【図11】検体-結合タンパク質がアガロース固定化アビジンである酵素-ドナーCNBr2と酵素-アクセプターEA23の相補の阻止を例示する競合的結合曲線を示すグラフである。

【図12】 5×10^{-8} Mに固定されたEA23および1:20と1:30希釀の酵素-ドナー結合体で得られた投与量応答曲線を表わすものである。

【図13】 1×10^{-7} Mに固定されたEA23および1:20と1:30希釀の酵素-ドナー結合体で得られた投与量応答曲線を表わすものである。

【図14】第二抗体、ヤギ抗ウサギ抗体が、相補プロセスにおいて酵素-ドナー結合体との抗体相互作用の阻害

効果を高めるために用いられるジゴキシンのための免疫検定法に関する投与量応答曲線を表わすものである。

【図15】種々の遺伝子領域および制限酵素開裂部位を示す、プラスミドp169の図解的表示である。ただし、一定の比率に拡大してしたものではない。

【図16】ED1およびED3に関しコードする遺伝子の部位のヌクレオチド配列を表わすものである。関連アミノ酸配列および制限酵素開裂部位が示される。ED3 N-末端フラグメントのCys(システイン)残基における星印は検体カップリング残基を示すものである。

【図17】種々の遺伝子領域および制限酵素開裂部位を示す、p180シリーズのプラスミドの図解的表示である。ただし、一定の比率に拡大してしたものではない。

【図18】ED3およびED4のアミノ酸配列を表わすものである。Cys残基上の星印は、検体カップリング残基を示すものである。

【図19】図19AおよびBは、それぞれED酵素ドナー、ED3およびED4のアミノ酸配列を示すものである。ただし、残基上の星印は検体カップリング残基を示す。

【図20】図20AおよびBは、それぞれED酵素ドナー、ED5およびED7のアミノ酸配列を示すものである。ただし、残基上の星印は検体カップリング残基を示す。

【図21】図21AおよびBは、それぞれED酵素ドナー、ED8およびED13のアミノ酸配列を示すものである。ただし、残基上の星印は検体カップリング残基を示す。

【図22】図22AおよびBは、それぞれED酵素ドナー、ED14およびED15のアミノ酸配列を示すものである。ただし、残基上の星印は検体カップリング残基を示す。

【図23】それぞれED酵素ドナー、ED17のアミノ酸配列を示すものである。ただし、残基上の星印は検体カップリング残基を示す。

【図24】種々の遺伝子領域および制限酵素開裂部位を示す、p190シリーズのプラスミドの図解的表示である。ただし、一定の比率に拡大してしたものではない。

【図25】ジゴキシン酵素免疫検定法におけるジゴキシン-ED3Aを用いるジゴキシンに関する滴定曲線を示すグラフである。

【図26】ED4-T4、EA22および第二抗体を用いるチロキシン(T4)検定からの標準曲線を示すグラフである。

【図27】ED5-ジゴキシン、EA22および第二抗体を用いるジゴキシン検定からの標準曲線を示すグラフである。

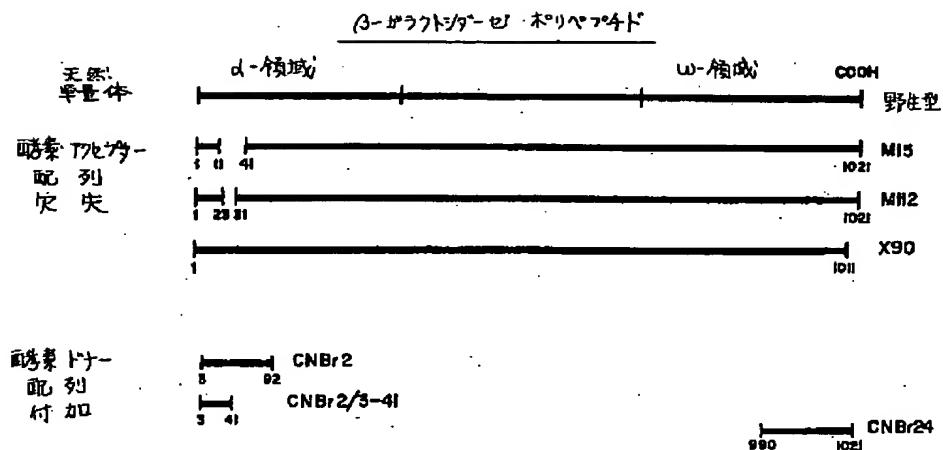
【図28】種々の遺伝子領域および制限酵素開裂部位を示す、プラスミドp166、p175、p177の図解的表示である。ただし、一定の比率に拡大してしたもの

ではない。

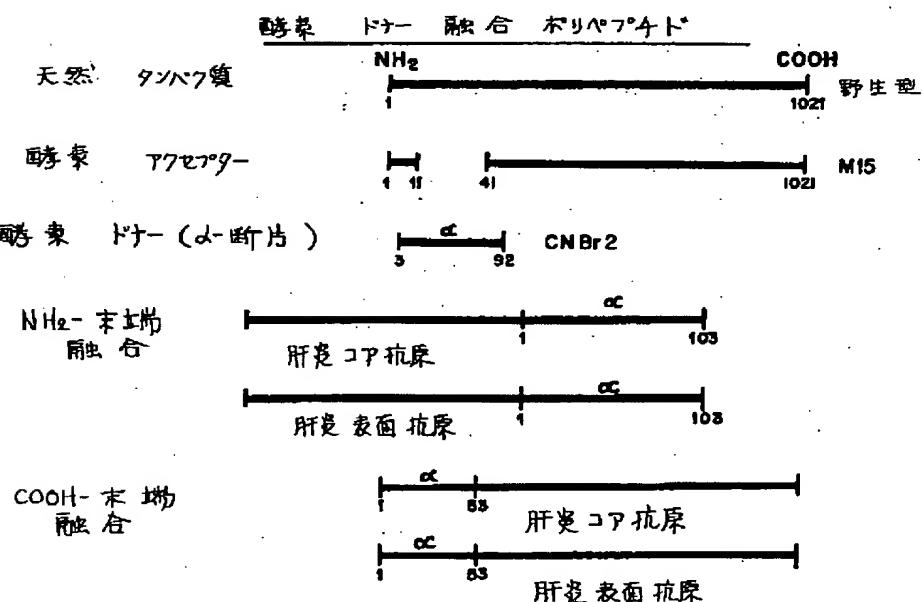
検定法に関する投与量応答曲線を表わすものである。

【図29】ヒト絨毛性ゴナドトロピンのための均質系の

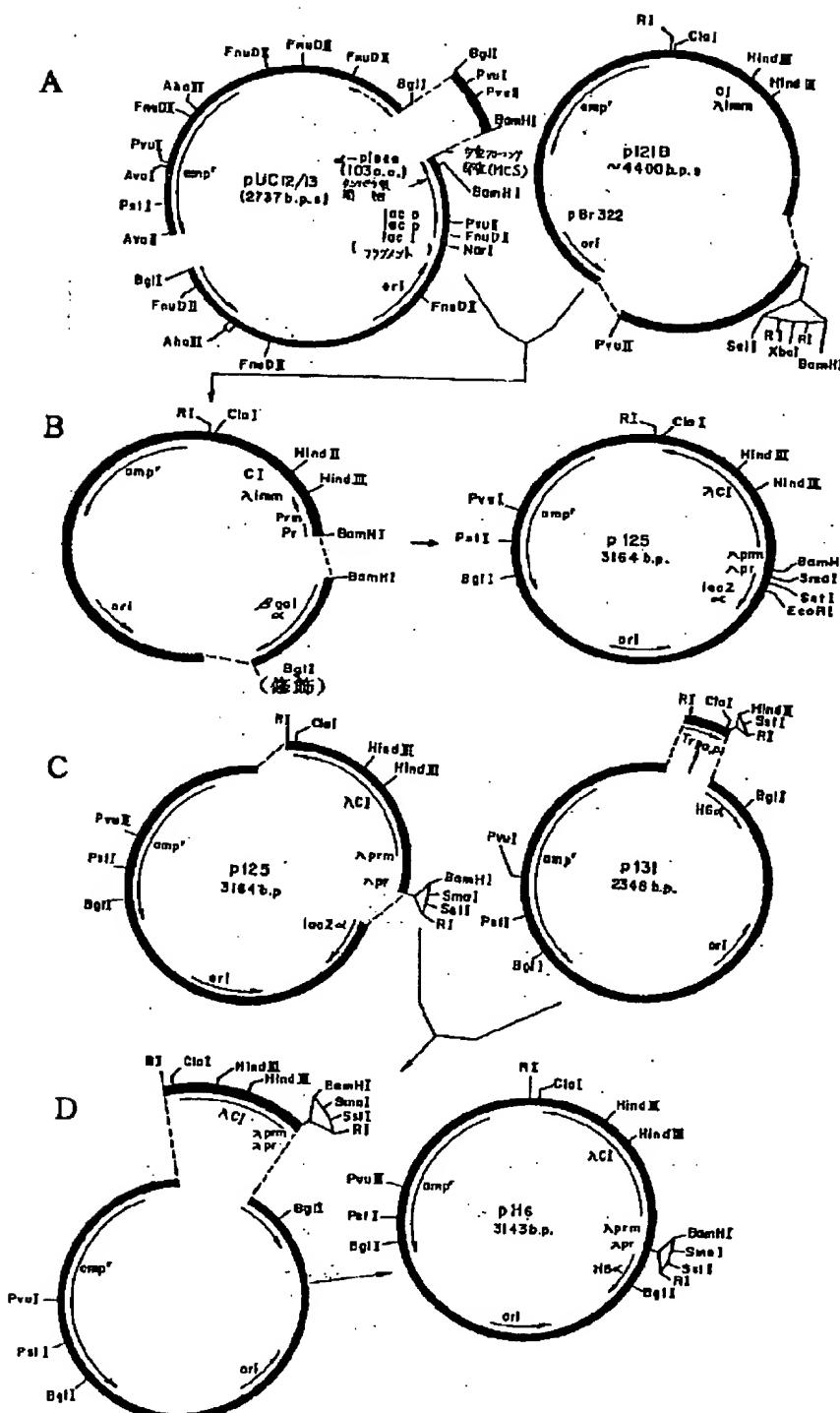
【図1】



【図3】



【図2】



【図4】

d-断片クローニングのDNAおよびアミノ酸配列

他のクローニングのN末端は次のようにである:(除く p148)

M D P R A S S S N S L A V
ATG GAT CCC CGG GCG AGC TCG AAT TCA CTG GCG GTC
V L Q R R D W E N P G V
GTT TTA CAA CGT CGT GAC TGG GAA GGC CCT GCG GTT
T E L W R L A A H P P F
ACC CAA CCT ATT CGC CTT GCA GCA CAT CCC CCT TTC
A S W R N S E E A R T
GCC AGC TGG CGT AAT AGC GAA GAG GCC CGC ACC (147
アミノ酸)

各クローニングの次の断片を示すようにである:

D R P S Q O L L C* G V K*
M9: GAT CGC CCT TCC CAA CAG TTG CTA TGC GGT GTG AAA
Y R T D A -
TAC CGC ACA GAT GCG TAA (17
アミノ酸)

D R P S Q O L R S L C* G
B9: GAT CGC CCT TCC CAA CAG TTG CGC AGC CTA TGC GGT
V K* Y R T D A -
GTG AAA TAC CGC ACA GAT GCG TAA (19
アミノ酸)

【図6】

 α -断片クローニングのDNAおよびアミノ酸配列

M D P L E S T C* S P S L
p148: ATG GAT CCT CTA GAG TCG ACC TGC AGC CCA AGC TTG
A L A V V L D R R D W E
GCA CTG GCG GTC CTT TTA CAA CGT CGT GAC TGG GAA
N P G V T Q L N R L A A
ACC CCT GGC GTT ACC CAA CCT ATT CGC CTT GCA GCA

H P P F A S W R N S E E
CAT CCC CCT TTC GCG AGC TGG CGT AAT AGC GAA GAG
A R T D R P S Q O L R S
GCC CGC ACC GAT CGC CCT TCC CAA CAG TTG CGC AGC
L N G E W R L M R Y F L
CTG AAT GGC GAA TGG CGC CTG ATG CGG TAT TTT CTC
L S H L C* G I S H R I W
CTT AGC CTA CTG TGC GGT ATT TCA CAC CGC ATA TGG
C* T L S T I C* S D A D -
TGC ACT CTC AGT ACA ATC TGC TCT GAT GCG GAC TAG (95
アミノ酸)

クローニング	アミノ酸数	CYS*の位置	LYSの位置
M9	64 (50)	56 (54)	58 (54)
B9	66	58	60
H6	70	62	64
P6	107	50,56	60,90,105
P125	69	58	-
P148	95	8,77,85,91	-

【図5】

d-断片クローニングのDNAおよびアミノ酸配列H6: D R P S Q O L R S L N G
ATG CGC CCT TCC CAA CAG TTG CGC AGC CTG AAT GGCE L C* G V K* Y R T D A -
GAA TTA TGC GGT GTG AAA TAC CGC ACA GAT GCG TAA (23
アミノ酸)

P6: M R C* E I P H R C* V R R
ATG CGG TGT GAA ATA CGG CAC AGA TGC GTC AGG AGA

K* Y R I R R S S A S S L
AAA TAC CGC ATC AGG CGC TCT TCC GCT TCC TCG CTC

T D S L R S V V R L R R
ACT GAC TCG CTG CGC TCG GTC GTT CGG CTG CGG CGA

A Y S A H S K* A V I R L
GCG GTA TCA GCT AAC TCA AAG GCG GTA ATA CGG TAA

S T E S G D N A G K* H M -
TCC ACA GAA TCA CGG GAT AAC GCA GGA AAG AAC ATG TGA (60
アミノ酸)

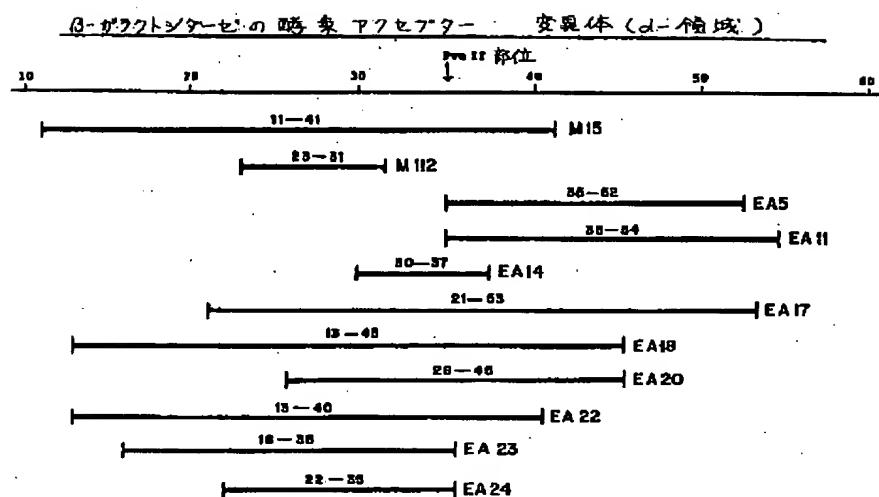
P125: D R P S Q O L R S L C* L
ATG CGC CCT TCC CAA CAG TTG CGC AGC CTC TGC CTC

A R F G D D G E H L -
GCG CTC TTC GGT GAT GAC GGT GAA ACC CTC TGA (22
アミノ酸)

【図9】

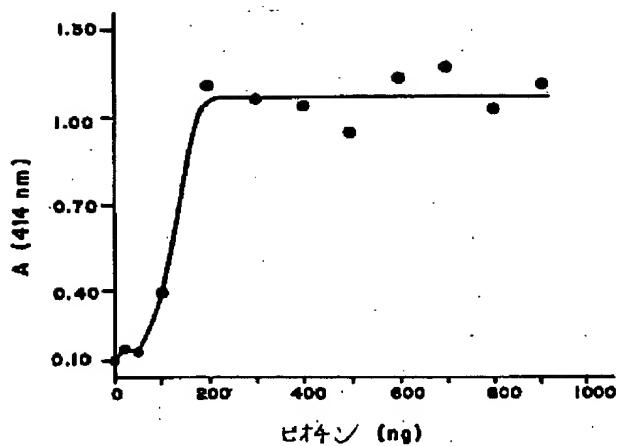
Moles ピオラン x 10 ⁻¹² / 株式会社	O.D.
4.2	0.15
6.5	0.24
7.8	0.27
2.8	0.30

〔图7〕

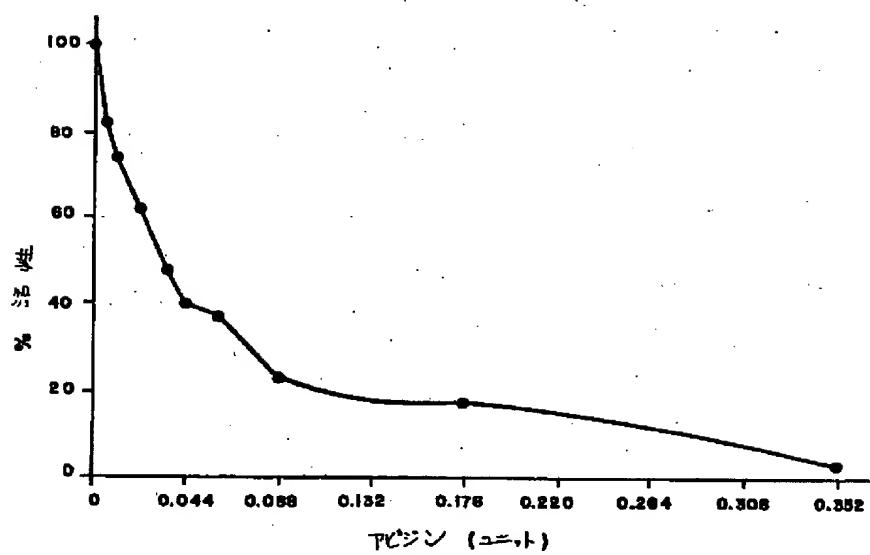


【図8】

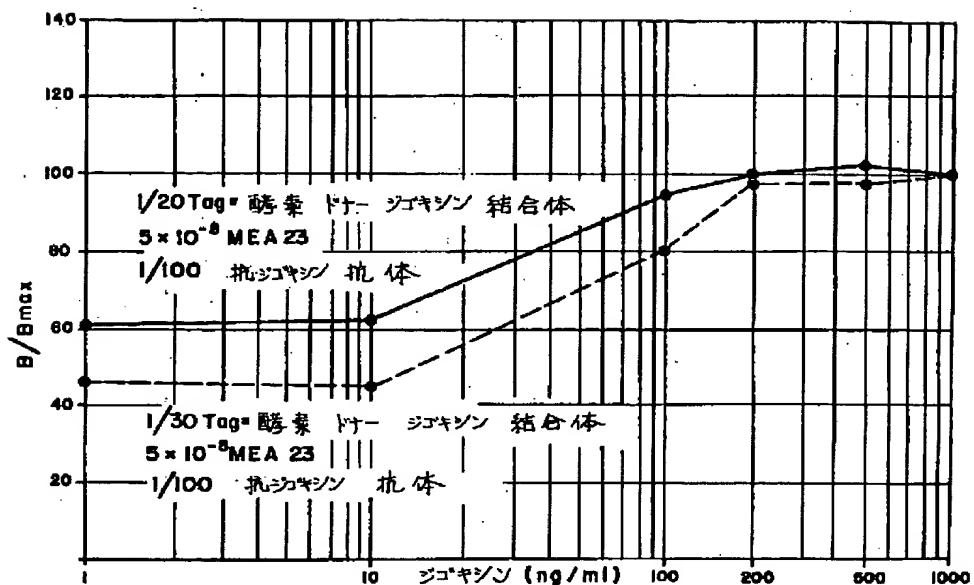
【図10】



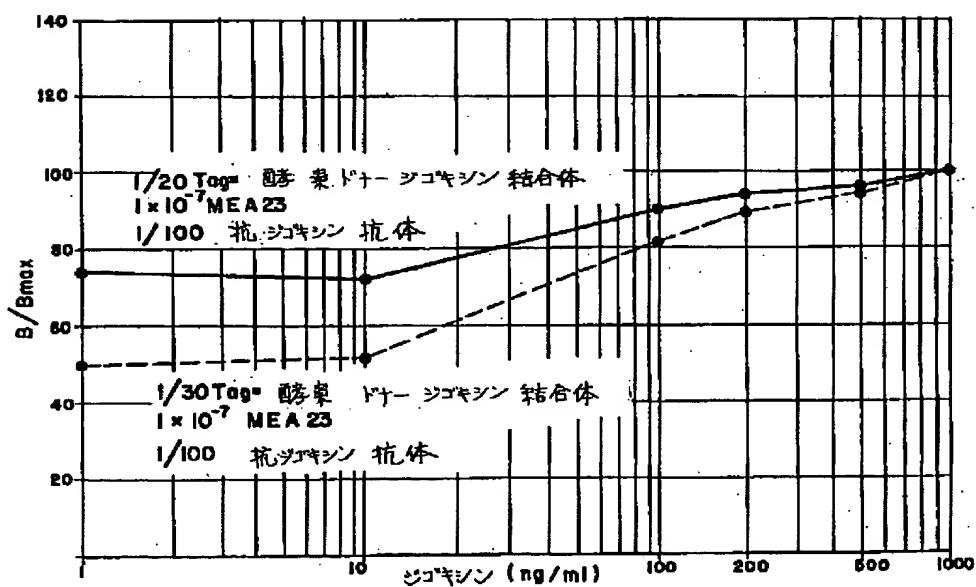
【図11】



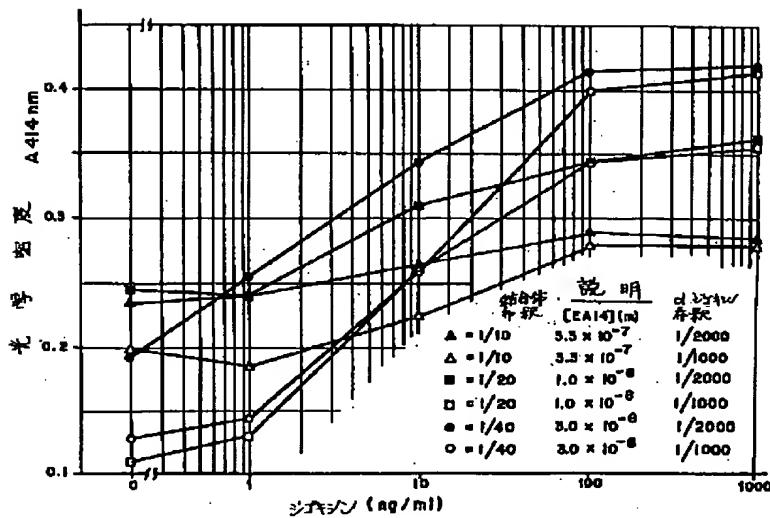
【図12】



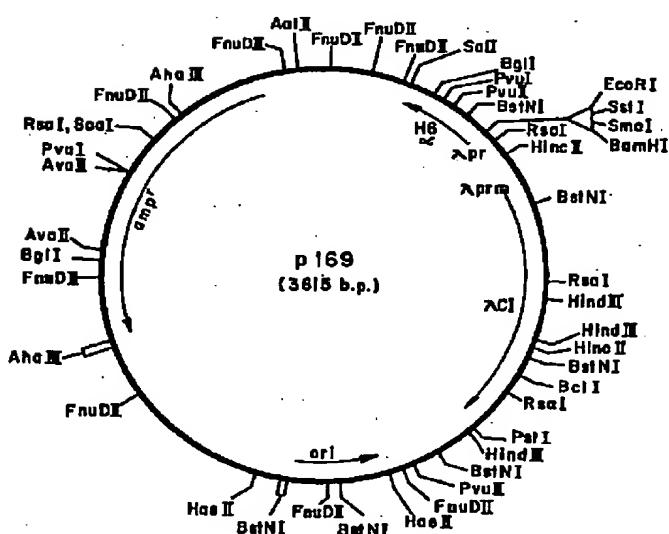
【図13】



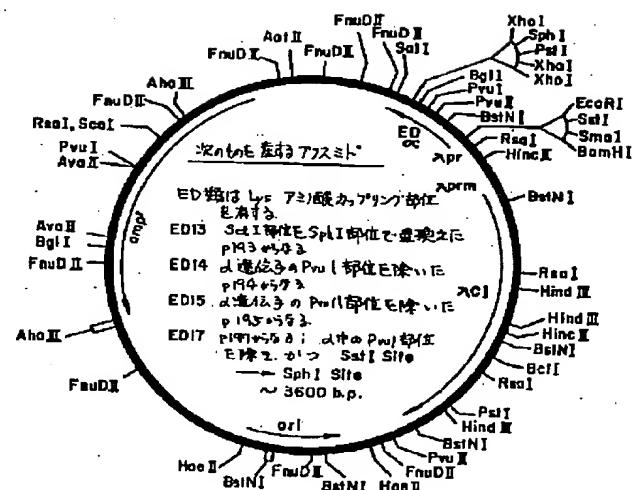
【図14】



【図15】



【図24】



【図16】

Met Asp Pro Ser Gly Asn Pro Tyr Gly Ile Asp Pro Thr Glu Ser Ser Pro Gly Asn Ile Asp Pro Arg Ala Ser Ser
 ED 1 Bam HI GAT CCT ACC GGC AAC DCA TAT GGT GAT CGT CGG ACT CGG AGC TCT CCT GGC AAC ATC GAT GTC Sst I Encore
GG TGC CGG TGC CGT ATA CCA TAG CTR GGC TGA GTC TCC AGA CGA CGG TCG CTA GGG ACC CGC TCG ACC TTA A
 N末端アミノ酸

Gly Leu Glu Ser Arg Ser Ala Gly Met Pro Leu Glu - - -

Bgl II

ED 1 (ED 3) Bgl I Xba I Xba I Pst I Sph I Xba I Bgl I Sph I Sal I
GAT CCT ACC GGC AAC DCA TAT GGT GAT CGT CGG ACT CGG AGC TCT CCT GGC AAC ATC GAT GTC ATT ATC ACT CGC CT
 C末端アミノ酸

Met Asp Pro Ser Gly Asp Pro Arg Ala Cys Ser

ED 3 Bam HI GAT CCT ACC GGC GAT GTC CGG GCA TGC TGG Sma I Sph I Eco RI
GG TGC CGG TGC CGT ATA CCA TAG CTR GGC CGC CGT AGC ACC TTA A
 N末端アミノ酸

ED3

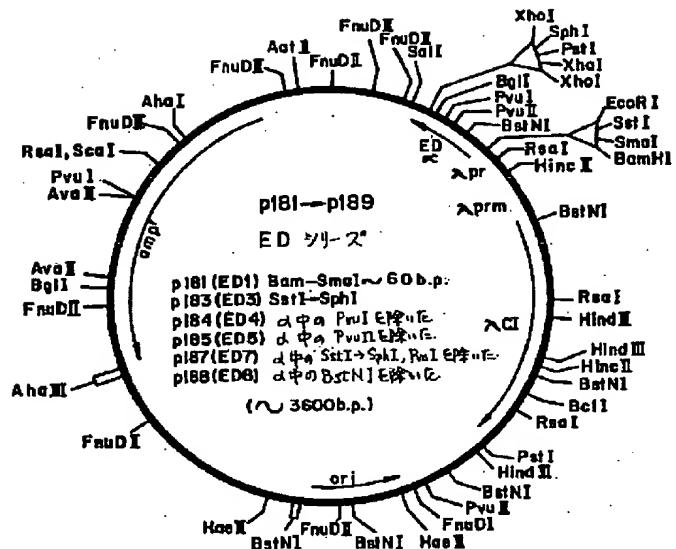
Asp Pro Ser Gly Asp Pro Arg Ala Cys Ser
 Ser Leu Ala Val Val Leu Glu Arg Arg Asp Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Glu Leu Asn Arg Leu Ala Ala His Pro Pro
 Pro Ala Ser Trp Arg Asn Ser Glu Glu Ala Arg Thr Asp Arg Pro Ser Glu Glu Asn Leu Arg Ser Leu Asn Gly Leu Glu Ser
 Arg Ser Ala Gly Met Pro Leu Glu

ED3A

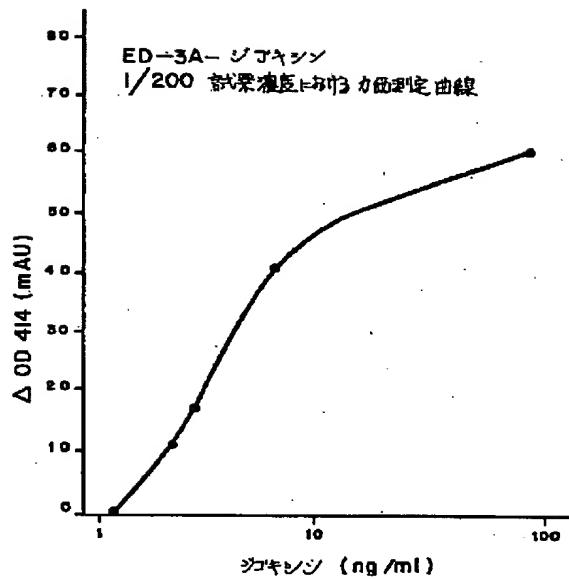
Cys Ile Thr Asp
 Ser Leu Ala Val Val Leu Glu Arg Arg Asp Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Glu Leu Asn Arg Leu Ala Ala His Pro Pro
 Pro Ala Ser Trp Arg Asn Ser Glu Glu Ala Arg Thr Asp Arg Pro Ser Glu Glu Asn Leu Arg Ser Leu Asn Gly Leu Glu Ser

【図18】

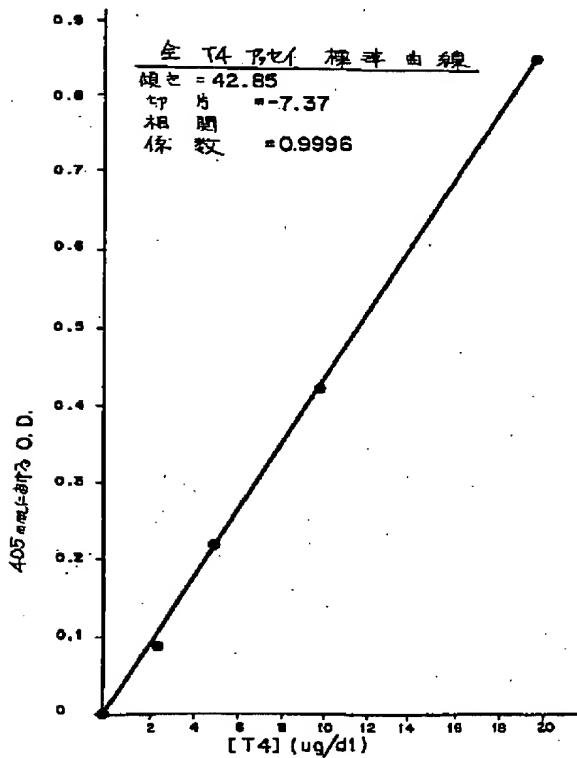
【図17】



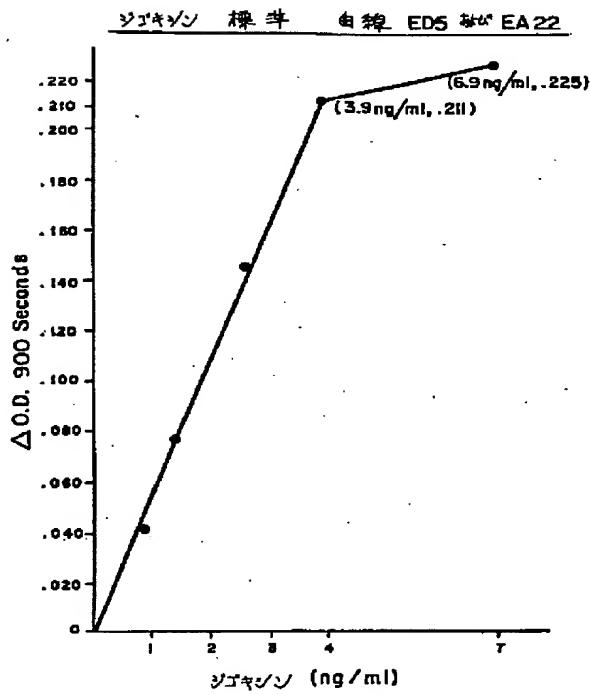
【図25】



【図26】



【図27】



【図19】

アミノ酸配列

A

ED3

5 Arg Ala Cys Ser Asn Ser Leu Ala Val Val Leu Glu Arg Arg Asp Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Glu Leu Asn
10
15
20
25

30 Arg Leu Ala Ala His Pro Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Glu Glu Ala Arg Thr Asp Arg Pro Ser Gln Gln
35
40
45
50

55 Leu Arg Ser Leu Asn Gly Leu Glu Ser Arg Ser Ala Gly Met Pro Leu Glu -

60
65

B

EDA

-5 Met Asp Pro Ser Gly Asn Pro Tyr Gly Ile Asp Pro Thr Glu Ser Ser Pro Gly Asn Ile Asp Pro
0
-10
-15

5 Arg Ala Ser Ser Asn Ser Leu Ala Val Val Leu Glu Arg Arg Asp Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Glu Leu Asn
10
15
20
25

30 Arg Leu Ala Ala His Pro Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Glu Glu Ala Arg Thr Asp Cys Pro Ser Gln Gln
35
40
45
50

55 Leu Arg Ser Leu Asn Gly Leu Glu Ser Arg Ser Ala Gly Met Pro Leu Glu -

60
65

【図20】

丁三) 酸 配列

15

1

Amino Acid	Relative abundance
Met	~0.5
Asp	~1.5
Pro	~1.0
Ser	~1.0
Gly	~0.5
Asp	~1.0
Pro	~0.5

Arg Ala Ser Ser Lys Ser Asn Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Arg Asp Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Glu Leu Asn
 Arg Leu Ala Ala His Pro Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Cys Glu Ala Arg Thr Asp Arg Pro Ser Gln Gln

Leu Ser Ala Gly Ser Arg Ser Ala Gly Met Pro Leu Glu -

EDT

1

Met Asp Pro Ser Gly Asp Pro

Arg Ala Cys⁵ Ser Asn Ser Leu Ala Val Val Gln Arg Arg¹⁰ Trp Glu Asn Pro Gly¹⁵ Val Thr Glu Leu Asn²⁰ Pro²⁵ Ser Glu³⁰ Asn³⁵ Ser Glu⁴⁰ Asn⁴⁵ Ser Glu⁵⁰

Leu Arg Ser Ile 55 Asn Gly Leu Glu Ser 60 Arg Ser Ala Gly Met Pro Leu Glu 65 -

7.1 酶 配列

EDB

A

Arg Ala Ser Ser Asn Ser Leu Ala Val Val 5
Leu Glu Arg Asp Trp Ala Ser Trp Arg Asn Arg 10
Asn Pro Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Trp 15
Arg Ala Ala His Pro Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn 20
Ser Asn Gly Leu Glu Ser Arg Ser Ala Gly Met 25
Leu Glu Ala Arg Thr Asp Arg Pro Ser Gln Gln 30
Leu Arg Ser Leu Asn Gly Leu Glu Ser Arg Ser Ala 35
Gly Met Pro Leu Glu - 40
Leu Arg Ser Leu Asn Gly Leu Glu Ser Arg Ser Ala 45
Gly Met Pro Leu Glu - 50
Leu Arg Ser Leu Asn Gly Leu Glu Ser Arg Ser Ala 55
Gly Met Pro Leu Glu - 60
Leu Arg Ser Leu Asn Gly Leu Glu Ser Arg Ser Ala 65
Gly Met Pro Leu Glu -

EDB

B

Arg Ala Lys Ser Asn Ser Leu Ala Val Val 5
Leu Glu Arg Asp Trp Ala Ser Trp Arg Asn Arg 10
Asn Pro Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Trp 15
Arg Ala Ala His Pro Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn 20
Ser Asn Gly Leu Glu Ala Arg Thr Asp Arg Pro Ser Gln 25
Gly Met Pro Leu Glu - 30
Leu Arg Ser Leu Asn Gly Leu Glu Ser Arg Ser Ala 35
Gly Met Pro Leu Glu - 40
Leu Arg Ser Leu Asn Gly Leu Glu Ser Arg Ser Ala 45
Gly Met Pro Leu Glu - 50
Leu Arg Ser Leu Asn Gly Leu Glu Ser Arg Ser Ala 55
Gly Met Pro Leu Glu - 60
Leu Arg Ser Leu Asn Gly Leu Glu Ser Arg Ser Ala 65
Gly Met Pro Leu Glu -

【図21】

【図22】

乙二酸 配列

ED14

Net Asp Pro Ser Gly Asn Pro Tyr Gly Ile Asp Pro Thr Glu Ser Ser Pro Gly Asn Ile Asp Pro
 Arg Ala Ser Ser Asn Ser Leu Ala Val Val Gln Arg Arg Asp Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Glu Leu Asn

11

ED15

1

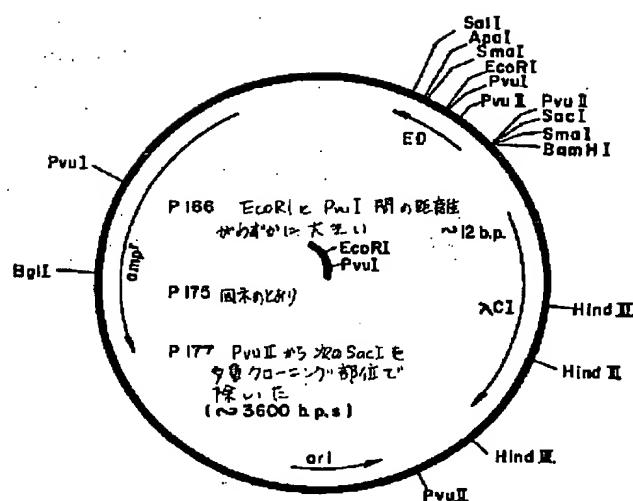
Arg Ala Ser Ser Asn Ser Leu Ala Val Val 10
 Arg Leu Ala Ala His Pro Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Lys Glu Glu 30
 Leu Arg Ser Leu Asn Glu Leu Glu Ser Arg Ser Asn Glu Met Ser Leu Glu 50
 5 15 20 25 40 45 55
 Met Asp Pro Ser Gly Asp Pro
 0

[図23]

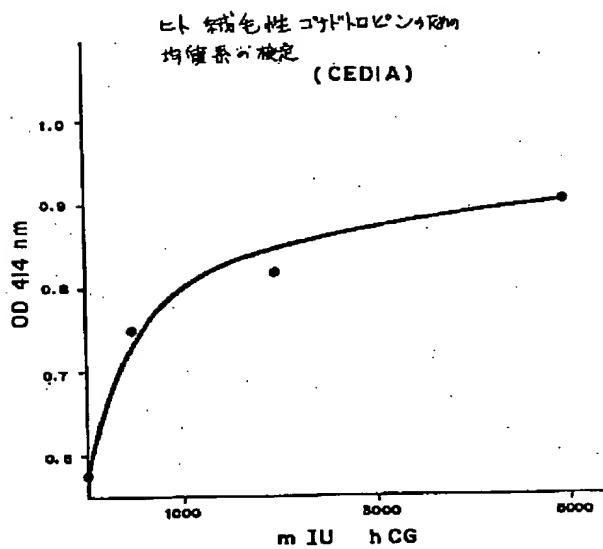
アミノ酸配列ED17

Arg Ala Lys Ser Asn Ser Leu Ala Val Val 5
 10 Leu Gln Arg Arg Asp Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Glu Leu Asn
 15
 20
 25
 Arg Leu Ala Ala His Pro Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Glu Glu Ala Arg Thr Asp Lys Pro Ser Gln Gln
 30 35 40 45 50
 Leu Arg Ser Leu Asn Gly Leu Glu Ser Arg Ser Ala Gly Met Pro Leu Glu -
 55 60 65

【図28】



【図29】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ^e	識別記号	府内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 21/02		C 9282-4 B		
G 0 1 N 33/535				
	33/542	B		
// C 1 2 N 9/38				
C 1 2 Q 1/34		6807-4 B		
(C 1 2 N 1/21				
C 1 2 R 1:19)				
(C 1 2 P 21/02				
C 1 2 R 1:19)				